

11680

2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

"EVALUACION DE UN MODELO DE TOXOCARIASIS OCULAR Y SISTEMICA EMPLEANDO JERBOS (Meriones unguiculatus)"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

D O C T O R

en microbiología

P R E S E N T A :

M. en C. FERNANDO ALBA HURTADO

DIRECTORA: DRA. GUADALUPE ORTEGA PIERRES

ASESORES: DR. JORGE L. TORTORA PEREZ

DR. VICTOR K. TSUTSUMI

273795

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1999.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



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.

# **JURADO**

<b>PRESIDENTE</b>	<b>DR. FRANCISCO TRIGO TAVERA</b>
<b>PRIMER VOCAL</b>	<b>DR. VICTOR K. TSUTSUMI FUJIYOSHI</b>
<b>SEGUNDO VOCAL</b>	<b>DRA. GUADALUPE ORTEGA PIERRES</b>
<b>TERCER VOCAL</b>	<b>DR. CARLOS A. VEGA Y MURGIA</b>
<b>SECRETARIO</b>	<b>DR. BENJAMIN NOGUEDA TORRES</b>
<b>SUPLENTE</b>	<b>DRA. CAMILA ARRIAGA DÍAZ</b>
<b>SUPLENTE</b>	<b>DR. JORGE LUIS TÓRTORA PÉREZ</b>

# **DEDICATORIA**

**A mi esposa Dra. Margarita Flores Grajeda  
y a mis hijos Fernando y Rodrigo  
Porque su amor es el motor de mi vida**

**A mi madre Sra. Juana Hurtado Prado  
A mi padre Sr. Dionisio Alba Castro†**

**A mis hermanos: Ma. Elena, Beatriz, Graciela, Ignacio,  
Eduardo, Dionisio, Jorge, Laura, Andrea y Alejandra**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. María Guadalupe Ortega Pierres por su enorme participación en mi formación doctoral , por sus atenciones y tiempo empleado en la dirección y revisión de este trabajo de tesis.

Al Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez por las valiosas asesorías aportadas a lo largo de este trabajo y por brindarme su invaluable amistad.

Al Dr. Víctor Tsutsumi por su valiosa asesoría y ayuda desinteresada a lo largo de este trabajo.

Al comité tutorial y jurado que evaluaron y corrigieron el presente trabajo.

**A LAS INSTITUCIONES QUE ME BRINDARON SU APOYO DURANTE MI FORMACIÓN DOCTORAL**

- Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
- Centro de Investigación y Estudios Avanzados de IPN (CINVESTAV).
- Dirección General de Superación académica de la UNAM (DGAPA).
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

A la MVZ Mónica Florez Nocedal, Biol. Rocío Fonseca Liñan, Biol. Arturo Pérez Taylor, Tec. Rene López Bolaños y Tec. Blanca Herrera Ramírez por su ayuda técnica prestada durante todo este trabajo de tesis.

Al Dr. Marco Antonio Vega López por brindarme su ayuda y amistad a lo largo de este trabajo

A todos mis compañeros y amigos de la FES-Cuautitlán y del Laboratorio 2 del Depto. de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV por el apoyo recibido.

El presente trabajo se realizo en el Depto. de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigaciones de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del IPN y la Unidad de Investigaciones Multidisciplinarias de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM. Bajo la dirección de la DRA. Ma. Guadalupe Ortega Pierres y la asesoría del Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez y el Dr. Víctor Tsutsumi Fujiyoshi

# INDICE

INDICE.....	I
ABREVIATURAS .....	IV
RESUMEN.....	VI
INTRODUCCIÓN	
Morfología.....	1
Ciclo biológico.....	2
Epidemiología.....	4
<i>Larva migrans visceral</i> .....	11
<i>Larva migrans ocular</i> .....	13
Antígenos de excreción secreción (Ag-SET).....	14
Modelos experimentales.....	15
JUSTIFICACIÓN.....	17
OBJETIVOS.....	18
MATERIAL Y METODOS.....	19
Animales.....	19
Obtención y cultivo de huevos de <i>T. canis</i> .....	19
Obtención y cultivo de larvas.....	19
Producción de Ag-SET.....	20
Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE).....	21
Transferencia de Ag-SET a papel de nitrocelulosa.....	22
Western blot.....	22
Purificación de gammaglobulinas de jerbos.....	23
Producción de sueros de conejo anti-gammaglobulinas de jerbo.....	23
Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para suero de conejo antigamma de jerbo.....	24
ELISA para evaluar los títulos de anticuerpos anti-Ag-SET en suero de jerbos experimentalmente infectados.....	25
Biometría hemática.....	26
Infección experimental.....	27
Protocolo experimental para la evaluación de cinética de distribución somática de larvas de <i>T. canis</i> en jerbos ( <i>Meriones unguiculatus</i> ).....	27
Protocolo experimental para la evaluación de las lesiones producidas por larvas de <i>T. canis</i> en jerbos experimentalmente infectados.....	28

Protocolo experimental para evaluar la respuesta de anticuerpos en una infección experimental por larvas de <i>T. canis</i> en jerbos.....	29
Análisis estadístico.....	30

## RESULTADOS

Cinética de migración de larvas de <i>T. canis</i> en jerbos inoculados intragástricamente con diferentes cantidades de hITc.....	31
Determinación de la concentración de larvas de <i>T. canis</i> en órganos de jerbos inoculados con diferentes cantidades de hITc.....	32
Determinación de la cantidad de linfocitos, eosinófilos, neutrófilos y monocitos en jerbos inoculados con diferentes cantidades de hITc.....	48
Determinación de la cantidad de hemoglobina y plaquetas en jerbos inoculados con diferentes cantidades de hITc.....	50
Cambios patológicos presentes en tracto digestivo de jerbos inoculados experimentalmente con 1000 hITc.....	64
Cambios patológicos presentes en pulmones de jerbos inoculados experimentalmente con 1000 hITc.....	64
Cambios patológicos presentes en hígado de jerbos inoculados experimentalmente con 1000 hITc.....	74
Cambios patológicos presentes en riñones de jerbos inoculados experimentalmente con 1000 hITc.....	75
Cambios patológicos observados en bazo de jerbos inoculados experimentalmente con 1000 hITc.....	92
Cambios patológicos observados en cerebro de jerbos inoculados experimentalmente con 1000 hITc.....	92
Cambios patológicos observados en tejido muscular de jerbos inoculados experimentalmente con 1000 hITc.....	103
Cambios patológicos observados en testículos de jerbos inoculados experimentalmente con 1000 hITc.....	104
Cambios patológicos observados en ojos de jerbos inoculados experimentalmente con 1000 hITc.....	109
Efecto de la infección experimental con larvas de <i>T. canis</i> en jerbos sobre la ganancia de peso en el momento del sacrificio.....	120
Análisis de los síntomas desarrollados en jerbos inoculados con 1000 hITc.....	120
Titulación de sueros de conejo antigammaglobulinas de jerbo.....	123

Análisis electroforéticos de las proteínas de secreción excreción de larvas de <i>T. canis</i> .....	123
Cuantificación de anticuerpos séricos contra Ag-SET detectados por ELISA en jerbos inoculados experimentalmente con hITc.....	123
Cuantificación de anticuerpos oculares contra Ag-SET detectados por ELISA en jerbos inoculados experimentalmente con hITc.....	124
Determinación de los Ag-SET reconocidos por sueros de jerbos inoculados experimentalmente.....	124
DISCUSIÓN.....	130
CONCLUSIONES.....	144
REFERENCIAS .....	148

# ABREVIATURAS

Acido peryódico de Schiff.....	P.A.S.
Acido clorhídrico.....	HCl
Acido-etilen-diamino-tetracético.....	EDTA
Análisis de Varianza.....	ANOVA
Antígenos de secreciones excreciones de <i>T. canis</i> .....	Ag-SET
Bioxido de Carbono.....	CO <sub>2</sub>
5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil fosfato.....	BCIP
Centímetros cuadrados.....	cm <sup>2</sup>
Cloruro de Magnesio.....	MgCl <sub>2</sub>
Cloruro de Sodio.....	NaCl
Colaboradores.....	Col
Daltons.....	D
Gammaglobulinas de Jerbo.....	GGJ
Geles de poliacrilamida con dodesil sulfato de sodio.....	SDS.PAGE
Grados centígrados.....	°C
Gramo.....	g
Gravedades.....	gs
Hematoxilina-Eosina.....	H-E
Hidroxido de Sodio.....	NaOH
Huevos larvados de <i>Toxocara canis</i> .....	hlTc
Inmunoensayo asociado a enzimas.....	ELISA
Inmunoglobulina E.....	IgE
Inmunoglobulina G.....	IgGs
Kilodaltons.....	kDa
<i>Larva migrans ocular</i> .....	LMO
<i>Larva migrans visceral</i> .....	LMV
Marcadores de Peso Molecular.....	MPM
Medio de cultivo celular de acuerdo a las iniciales del	

Roswell Park Memorial Institute.....	RPMI-1640
Microgramos.....	$\mu\text{g}$
Micrometros.....	$\mu\text{m}$
Miliamperes.....	mA
Miligramos.....	mg
Mililitros.....	ml
Milimetros.....	mm
Milimolar.....	mM
Molar.....	M
Minutos.....	min
Nanometros.....	nm
Normal.....	N
Nitroblue tetrazolium.....	NBT
Peso.....	p
Peso molecular.....	PM
Post-inoculación.....	p.i.
Por ciento.....	%
Solución Salina Amortiguadora de Fosfatos.....	PBS
Solución Salina Fisiológica.....	SSF
Sustrato de fosfatasa.....	NPP
Tris-Buffer Salino.....	TBS
Vols.....	V
Volumen.....	Vol

# RESUMEN

La toxocariasis es una enfermedad causada por el nemátodo *Toxocara canis*. Este, se localiza en su estado adulto en el intestino de perros, sus larvas pueden afectar a muchos animales que actúan como hospederos paraténicos, entre ellos los humanos. En éstos últimos resulta de especial importancia conocer la migración de larvas, la evolución de lesiones histopatológicas y la respuesta inmune desarrollada. Debido a la imposibilidad de realizar estos estudios en humanos, se ha propuesto el empleo de modelos experimentales en las que el parásito tenga un comportamiento similar. Para ello se han utilizado como modelos experimentales varias especies de animales, en donde la toxocariasis sistémica se puede inducir, sin embargo, en ellos la toxocariasis ocular es muy rara. Nuestro grupo, ha informado sobre infecciones experimentales en jerbos, en los cuales se presenta la toxocariasis ocular. Estos datos, aunque preliminares nos hicieron pensar que los jerbos podrían ser un modelo posible de toxocariasis ocular.

Considerando lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar el potencial del jerbo (*Meriones unguiculatus*) como un modelo experimental para el estudio de la toxocariasis, principalmente la ocular.

Se determinó comportamiento migratorio y la distribución somática de larvas de *T. canis* en jerbos (*Meriones unguiculatus*). Se inocularon intragastricamente con huevos larvados de *T. canis* (hITc) 3 grupos de 45 jerbos cada uno con tres dosis de (200, 1000 y 5000). Los animales se sacrificaron a distintos tiempos y se realizaron digestiones artificiales para cuantificar larvas en los distintos órganos. En los jerbos inoculados con 1000 y 5000 hITc se detectaron en forma constante pequeñas cantidades de larvas en ojos entre los días 5 y 60 p.i.. En el grupo inoculado con 200 hITc sólo se detectaron algunas larvas en ojos los días 30 y 60 p.i..

En los tres grupos la mayor concentración de larvas a las doce horas se presentó en intestino y desapareció a los 5 días. En pulmones se presentó la mayor concentración de larvas a los tres días p.i. y disminuyó en días posteriores. En el hígado la mayor concentración de larvas se presentó en los días 3 y 5, disminuyó la concentración en días posteriores. En el cerebro la concentración de larvas es mayor entre los días 30 y 60 p.i..

En los tres grupos a diferentes periodos se detectó leucocitosis, linfocitosis, eosinofilia, neutrofilia y monocitosis. No se presentaron diferencias significativa ( $p < 0.05$ ) en la cantidad de hemoglobina o en el número de plaquetas.

Para analizar la evolución de las lesiones producidas por larvas de *T. canis* en jerbos, se inoculados 45 jerbos con 1000 hITc. Se sacrificaron 5 animales del grupo inoculado a diferentes periodos p.i. En estos días se extrajeron por separado diferentes órganos (hígado, pulmones, riñones, bazo, esófago, estómago, intestino, tejido muscular, testículos, cerebro y ojos) y se describieron las lesiones macroscópicas en cada uno de ellos. Posteriormente todos los órganos se procesaron para cortes histológicos y se tiñeron por la técnica hematoxilina-Eosina.

El día 1 y 3 p.i. se observaron en serosa de intestino abundantes focos de inflamación aguda con infiltrado de neutrófilos y eosinófilos alrededor de larvas intactas.

En hígado, pulmones y riñones en los 1, 3 y 5 días p.i. fueron observadas lesiones de tipo agudo con larvas e infiltrado de neutrófilos y eosinófilos. Del día 10 al 60 p.i. las lesiones tienden a la cronicidad con infiltrado de linfocitos, macrófagos y presencia de fibrocitos y colágena. En riñón se detectaron glomerulitis y engrosamiento generalizado de las membranas basales lo que sugiere procesos de hipersensibilidad por complejos inmunes.

Los días 10 y 20 P.I se detectaron en cerebro larvas sin respuesta inflamatoria aparente. El día 60 p.i. se observaron larvas en zonas de degeneración y algunos con depósitos de calcio. La aparición de zonas de degeneración en cerebro a partir del día 40 se correlacionó con la aparición de manifestaciones nerviosas en los jerbos.

Los días 10 y 20 p.i. se detectaron larvas en coroides reacción inflamatoria y hemorragias en procesos ciliares. El día 30 p.i. se presentaron larvas e infiltrado de neutrófilos en procesos ciliares, larvas con hemorragia y edema en la retina. El día 40 p.i. se observaron larvas destruidas en zonas de retina y ligero infiltrado de neutrófilos y linfocitos. El día 60 p.i. se presentaron lesiones granulomatosas en retina y en procesos ciliares.

Para estudiar la respuesta inmune humoral y ocular, particularmente hacia antígenos de secreción y excreción (Ag-SET) se inocularon 35 jerbos con 1000 hITc y 5 animales

control sólo recibieron SSF. Posteriormente se sacrificaron 5 animales a los días 5, 10, 20, 30, 40, 60 y 130 p.i. y se obtuvo suero y líquido intraocular de cada uno y se analizaron por ELISA empleando Ag-SET. En suero los de anticuerpos empiezan a aumentar partir del día 10 p.i. , entre los días 20 y 130 p.i. se presentaron diferencias ( $p < 0.05$ ) con el grupo control. Los títulos de anticuerpos oculares contra Ag-SET empiezan a aumentar partir del día 30 p.i. , entre los días 40 y 130 p.i. se presentaron diferencias ( $p < 0.05$ ) con grupo de jerbos control. Mediante la técnica de Western blot se determinó que los sueros reconocieron hasta 8 bandas de Ag-SET. El análisis del reconocimiento antigénico mostró una reactividad gradual hacia estos antígenos, el día 20 p.i. reconocieron en forma leve una banda de 32 kDa, el día 30 reconocieron bandas de 120, 32, 29 y 24 kDa, el día 40 y día 60 reconocieron bandas de 120, 70, 66, 55, 32, 29 y 24 kDa y los sueros del día 130 p.i. reconocieron bandas de 200, 120, 70, 66, 55, 32, 29 y 24 kDa.

Los datos generados en este trabajo permitieron determinar que los jerbos son un buen modelo experimental de toxocariasis ocular y sistémica. En el futuro, este modelo experimental de toxocariasis permitirá realizar estudios profundos de evaluación de nuevos fármacos o de nuevas técnicas de diagnóstico a nivel ocular y generar estudios comparativos entre este modelo experimental y humanos con síndrome de *larva migrans visceral* y/o *larva migrans ocular*.

# INTRODUCCIÓN

La toxocariasis es una enfermedad causada por la presencia y acción del nemátodo parásito *Toxocara canis*. Éste, se localiza en su estado adulto en el intestino delgado del perro y sus larvas pueden afectar a muchos animales que actúan como hospederos paraténicos, entre ellos los humanos (Soulsby, 1982; Quiroz, 1984). Otros hospederos del parásito adulto son zorras (*Alopex lagopus* y *Vulpes vulpes*), coyotes (*Canis latrans*) y lobos (*Canis lupus*) (Dubey, 1982; Guberti *et al.*, 1993; Skirnisson *et al.*, 1993; Richards *et al.*, 1995)

## CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Reino: *Animalia*

Phylum: *Nemathelmintha*

Clase: *Nematoda*

Orden: *Ascaroidea*

Superfamilia: *Ascaridoidea*

Familia: *Ascaridae*

Genéro: *Toxocara*

Especie: *canis*

## MORFOLOGÍA

El parásito *T. canis* es un nemátodo de color blanco, los machos miden de 4 a 10 cm de longitud y las hembras hasta 18 cm. En la parte anterior presenta tres labios bien desarrollados, uno dorsal y dos subventrales provistos de dos papilas. La superficie interna

de cada labio puede llevar un borde dentífero o pequeños dientes. Posee alas cervicales que les dan aspecto de punta de flecha. El extremo posterior del macho termina curvado hacia su parte ventral, presenta dos pequeñas espículas iguales de 0.75 a 0.95 mm y un estrechamiento terminal en forma de apéndice. En las hembras la vulva se abre en la región media del cuerpo; éstas son ovíparas y producen una gran cantidad de huevos, no embrionados en el momento de la puesta (Soulsby, 1982; Dunn, 1983; Quiroz, 1984; Alba, 1994). Los huevos son subsféricos de 90 por 75 micrómetros y de color café, presentan tres capas de las cuales la más externa es muy fina y presenta hendiduras parecidas a perforaciones a las que se denomina fosetas (Alba, 1994).

## CICLO BIOLÓGICO

Aunque el ciclo biológico de *T. canis* es directo, son extremadamente complejas las relaciones entre este parásito y sus hospedadores. Esto último tiene que ser considerado ya que el pleno conocimiento del ciclo vital y la biología del un parásito son muy importantes para determinar su epidemiología y comprender los aspectos clínicos de la enfermedad (Alba, 1991).

El ciclo se inicia con la eliminación de huevos de *T. canis* en el excremento de los perros parasitados (principalmente cachorros), estos huevos son resistentes y duraderos en el ambiente. Sin embargo, la exposición a la luz solar y a una temperatura de 55.5 °C por una hora los mata. El desarrollo de la larva infectante requiere de 9 a 11 días a 24 °C y de 3 a 5 días a 30 °C, en presencia de oxígeno atmosférico y una humedad relativa del 75% (Olsen, 1974; Olsen, 1979; Beaver y col., 1981).

La infestación ocurre cuando los perros, humanos u otros hospedadores susceptibles ingieren huevos larvados, la eclosión ocurre en el duodeno y el segundo estadio larvario atraviesa la pared intestinal; las larvas pasan al flujo linfático o a capilares sanguíneos y por la vena porta llegan al hígado dos días después. Al cuarto día llegan al pulmón viajando por la vena cava, corazón derecho y arteria pulmonar. A partir de este punto, la ruta de migración y desarrollo de las larvas varía dependiendo de que el perro sea joven o adulto, hembra gestante, humano u otra especie animal (Olsen, 1974).

En perros adultos, las larvas de segundo estadio que llegan al pulmón regresan al corazón y se distribuyen por todo el cuerpo, llegando principalmente al músculo estriado, hígado, pulmones y riñones, donde permanecen en estado de latencia (Sprent, 1958; Beaver y col., 1981; Soulsby, 1982).

En cachorros, las larvas abandonan los capilares pulmonares, penetran en los alvéolos y migran por las vías respiratorias hasta la faringe (migración traqueal), en donde son deglutidas. Las larvas viven en el estómago hasta el décimo día post-infestación, posteriormente pasan al duodeno, donde se convierten en adultos entre los días 19 y 27 post-infestación. En este tiempo los parásitos son sexualmente maduros, se aparean y se inicia la producción de huevos fértiles entre las 4 y las 5 semanas post-infestación (Olsen, 1974; Soulsby, 1982).

Además de la infestación post-natal por la ingestión de huevos embrionados, los cachorros casi siempre se infectan prenatalmente en condiciones naturales. Esto último quizá bajo la influencia de las hormonas de las hembras en gestación, las larvas somáticas son reactivadas y penetran a los fetos entre los días 42 a 43 de la gestación (Douglas y Beker, 1959; Olsen, 1974). Esta última condición se ha podido reproducir experimentalmente al aplicar prolactina, hidrocortisona y oxitocina. Cuando las larvas alcanzan el hígado del feto tiene lugar una muda, transformándose en larvas de tercer estado, las cuales, al nacer los cachorros, aparecen en los pulmones y así permanecen durante la primera semana de vida. La muda al cuarto estadio se produce durante la primera semana, cuando las larvas están en pulmones o posteriormente en estómago. Hacia el fin de la segunda semana, las larvas mudan al quinto estadio. Posteriormente, experimentan un rápido crecimiento y las formas adultas pueden encontrarse al final de la tercera semana. El periodo de patencia de las infecciones prenatales varía entre los 23 y los 40 días después del nacimiento (Soulsby, 1982; Kirk, 1984; Merck, 1988).

Hasta ahora sólo se han mencionado las larvas de segundo estadio somático en perros adultos (adquiridas por la ingestión de huevos larvados). Estos perros raramente tienen parásitos adultos en el intestino. Sin embargo, después del parto, las larvas somáticas reactivadas pueden llegar al intestino de perras exentas de parásitos adultos. Estos parásitos maduran a los 25 ó 26 días post-parto y persisten un promedio de 60 días antes de ser

expulsados espontáneamente (Shrand, 1964; Olsen, 1974; Angus, 1983). No todas las larvas somáticas abandonan los tejidos durante una primera gestación, pues las subsecuentes camadas pueden nacer infestadas, incluso en perras protegidas contra reinfestaciones por ingestión de huevos.

La reactivación de las larvas somáticas continúa en la perra lactante y las larvas ganan acceso a la glándula mamaria, siendo expulsadas en la leche e infestando a la camada. La infestación posnatal de cachorros durante la lactancia es cuantitativamente tanto o más importante que la infestación prenatal *in utero* (Angus, 1983; Martínez, 1989).

El humano se puede infestar por la ingestión de huevos larvados de *T. canis*, las larvas evaden los alvéolos del pulmón y migran a diversos órganos como hígado, otras partes del pulmón, cerebro y ojo (Olsen, 1974; Cypes, 1982; Soulsby 1982).

## EPIDEMIOLOGÍA

La toxocariasis causada por *T. canis* es una de las principales enfermedades parasitarias de los perros. Su distribución geográfica es mundial, por su gran incidencia y patogenicidad al humano es un importante problema de salud pública (Schantz and Glickman, 1978; Soulsby, 1982).

Estudios realizados en México y en otros lugares del mundo demuestran la alta incidencia de esta parasitosis en perros ( Cuadros 1 y 2 ). Aunque estos se realizaron de manera aislada y presentaron diferencias en cuanto a la manera en la que se llevaron a cabo, dejan claro que son mucho más afectados por gusanos adultos los cachorros menores de seis meses que los perros adultos.

Una causa de la alta incidencia de esta parasitosis es el alto poder biótico que presentan estos parásitos, ya que las hembras depositan hasta 200 000 huevos diarios (Shrand, 1964; Warren and Mahmoud, 1977). Los huevos son altamente resistentes a las condiciones medio ambientales y son la fuente de infestación para perros, humanos y otros hospederos paraténicos (Soulsby, 1982).

La infestación por *Toxocara* se presenta en casi todas las crías de perros y gatos. Estos animales, que a menudo viven en los hogares en los que hay niños, expulsan a diario y durante muchos meses cantidades enormes de huevos en las heces, aunque estas heces se

eliminan en un lapso corto, los huevos que contienen se acumulan en el entorno. Cuando están protegidos de la luz solar directa y la desecación, los huevos se desarrollan hasta alcanzar la fase infectante en unas tres semanas y persisten viables en el suelo muchos meses. De este modo el suelo de las zonas en las que defecan los perros y gatos con toxocariasis se considera una fuente de infección constante. Además, debido a la acción de las lluvias, es posible que los huevos se transporten a lugares distantes y alcancen grandes concentraciones en algunos puntos. Unos miligramos de tierra recogida de la superficie de estos sitios pueden contener centenares de huevos infestantes, lo que hace posible que un niño que se lleve tierra a la boca ingiera miles de estos huevos y que niños mayores o adultos adquieran infestaciones ligeras, al ingerir cantidades imperceptibles de material altamente contaminado. El examen del suelo de parques y campos de juego de distintas ciudades de Chile, Gran Bretaña, Estados Unidos, Japón, Iraq, España, Irlanda, Brazil, Argentina, Irlanda, Alemania, Jordania, Holanda, Francia, Singapur, India, Nigeria, y México ha demostrado la presencia de huevos infestivos de *Toxocara canis*, que constituyen una fuente de infestación a niños y contribuyen a los elevados índices de parasitosis en perros y gatos, así como de otros hospedadores (Borg and Woodruff, 1973; Dada and Lindquist, 1979; Dunsmore et al., 1984; Duwel, 1984; Emehelu and Fakae, 1986; Salinas et al., 1987; Umeche, 1989; Horn et al., 1990; Choo, 1990; Abo.Shehada and Ziyadeh, 1991; Holland et al., 1991; Bryden, A.S., 1992; Igarashi and Yatomi, 1992; Gunaseelan, L. et al., 1992; Sommerfelt et al., 1992; Uga and Kataoka, 1993; Beugnet and Gadat, 1993; Minvielle et al., Shimizu, 1993; Jansen, et al, 1993; Mahdi and Ali, 1993; O’Lorcain, 1994a; Patiño y Cruz, 1992; Toledo y col., 1994; Costa et al. 1994; Martínez-Barbosa y col, 1996; Fernández-Presas y col., 1996; Uga et al., 1996).

La alta incidencia de personas con anticuerpos anti-toxocara en diferentes lugares del mundo se presentan en la cuadro 3. En esta se concentra información que indica el alto grado de infestación por esta parasitosis, 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.

# CUADRO 1

LUGAR	AÑO	No. DE PERROS EXAMINADOS	TIPO DE EXAMEN	FRECUENCIA (%)	REFERENCIA
Canada	1975	239	CPS	43.5	Seah et al., 1975
Accra, Ghana	1975	100	N	40.0	Anteson & Corkish, 1975
Londres, Inglaterra	1977	1000	CPS	7.2	Turner & Pegg, 1977
Indiana, EUA	1978	108	N	18.3	Kazacos, 1978
Halifax, Nueva Escosia	1978	474	CPS	26.6	Malloy and Embil, 1978
Iowa st, EUA	1978	33594	CPS	3.0	Lightner L., 1978
Zaria, Nigeria	1979	180	CPS	41.1	Dada et al., 1979
Pretoria, Sudafrica	1979	253	N	32.0	Verster, 1979
Bangkok, Tailandia	1980	107	CPS	6.5	Hinz, 1980
Praga, Checoslovaquia	1982	500	CPS	4.2	Valkounova, 1982
Chicago, EUA	1982	846	CPS	4.3	Jaskoski B.J. et al., 1982
Sabah, Malasia	1984	175	CPS	81.0	MacAdam et al. 1984
Freetown, Sierra Leona	1984	2938	CPS	9.0	Hassan, 1984
Hessian Neckar Valley, Alemania.	1985	155	CPS	5.8	Hinz & Blatz, 1985
Calabar, Nigeria	1985	254	CPS	26.7	Ugochukwu & Ejimadu, 1985
Tenerife, España	1985	463	CPS	16.2	Valladares et al. 1985
Baghdad, Irak	1986	20	N	40.0	Tarish et al., 1986
Atlanta, EUA	1987	143	CPS	12.0	Stehr-Green et al., 1987
La Plata, Argentina	1988	2895	CPS	14.2	Venturini & Radman, 1988

Curasao	1988	133	CPS	7.5	Saleh et al., 1988
Grecia	1988	232	CPS	22.4	Haralabidis et al., 1988
Asturias, España	1989	354	CPS	1.1	Vazquez-Valdez, 1989
Kingston, Jamaica	1989	141	CPS	8.0	Robinson et al., 1989
Belgica	1991	2324	CPS	17.4	Vanparijs et al., 1991
Chinamora, Zinbabwe	1991	42	N	9.0	Owolo et al., 1991
Ankara, Turquía	1992	121	CPS	13.2	Cerci, 1992
Ankara, Turquía	1992	269	CPS	26.0	Zeybek et al., 1992
		33	N	9.0	Zeybek et al., 1992
Montenegro, Yug.	1992	15	N	30.0	Katic & Popovic, 1992
Nairobi, Kenia	1993	156	N	3.0	Wachira et al., 1993
Oklahoma st., USA	1993	21583	CPS	4.0	Jordan, et al., 1993
Dakar, Senegal	1993	72	N	8.7	Pangui & Kaboret, 1993
Ibaraki, Japón	1993	153	N	9.4	Nakauchi et al., 1993
Hannover, Alemania	1993	3329	CPS	6.9	Epe et al., 1993
Melbourne, Australia	1993	493	CPS	17.4	Johnston & Gasser, 1993
Dublin, Irlanda	1994	350	CPS	82.6	O'Lorcain P., 1994b
Kansas, EUA	1994	218	CPS	4.0	Ridley et al., 1994
Lugano, Suiza.	1995	217	CPS	17.0	Dada et al., 1979
Sao Paulo, Brazil	1995	314	CPS	16.6	Farias et al., 1995
Ibaraki, Japon	1997	916	N	79.9	Saeki et al., 1997
Amsterdam, Holanda	1997	272	CPS	2.9	Overgaauw, 1997
Taimei, Taiwan.	1997	96	N	27.0	Fei-Chang & Mo-Kang, 1997

Frecuencia de *Toxocara canis* en perros de diferentes lugares del mundo. N=necropsia, CPS=coproparasitoscópico

## CUADRO 2

LUGAR	AÑO	No. DE PERROS EXAMINADOS	TIPO DE EXAMEN	FRECUENCIA (%)	REFERENCIA
México D.F.	1955	100	N	30.0	Flores, 1955
México D.F.	1967	120	CPS	93.0	Quiroz, 1982
México D.F.	1969	50	CPS	20.0	Escalante, 1969
Veracruz, Ver.	1970	300	CPS	9.6	Franyutti, 1970
Monterrey, N.L.	1972	100	N	5.0	Garza, 1972
Guadalajara, Jal.	1973	450	CPS	16.2	Mora de la, 1973
Cuernavaca, Mor.	1974	719	CPS	15.0	Quiroz, 1982
Aguascalientes, Ags.	1983	294	CPS	47.6	Valdivia et al., 1983
México D.F.	1986	200	CPS	21.0	Cruz y col., 1986
México D.F.	1987	176	N	58.5	Cruz y col, 1987
Pungarabato y Cutzamala, Gro.	1989	106	CPS	37.7	Barrera & Fragoso, 1989
Veracruz, Ver.	1989	447	CPS	74.0	Zermeño y col, 1989
México, D.F.	1990	463	CPS	4.9	Cruz y col, 1990
México, D.F.	1992	240	CPS	3.6	Penagos y col. 1992
Culiacan, Sin,	1996	100	CPS	7.0	Gaxiola y col, 1996
México, D.F.	1996	47	CPS	100.0	Vega & Rivera, 1996
México, D.F.	1998	100	N	15.0	Martínez y col, 1998
México, D.F.	1998	470	CPS	19.8	Eguia-Aguilar, 1998

Frecuencia de *Toxocara canis* en diferentes lugares de la república mexicana. N= necropsia, CPS=coproparasitoscópicos

### CUADRO 3

LUGAR	AÑO	NO. DE MUESTRAS	TIPO DE EXAMEN	FRECUENCIA (%)	REFERENCIA
Alemania Occidental	1977	2864	MP	8.6	Preissshofen & Lamina, 1977
Inglaterra	1979	922	ELISA	2.6	De-Savigni, 1979
Pennsylvania., EUA	1980	47	ELISA	54.0	Jones et.al, 1980
Alemania occidental	1980	4656	O	15.1	Lamina, 1980
Estados Unidos	1984	333	ELISA	21.1	Worley et al., 1984
Estados Unidos	1985	1409	ELISA	7.0	Herrmann et al., 1985
Zurich, Suiza	1986	665	ELISA	5.1	Sturchler et al., 1986
EUA	1986	333	ELISA	23.1	Ellis et al., 1986
Canberra, Australia	1986	660	ELISA	7.0	Nicholas et al., 1986
Suecia	1989	323	ELISA	7.0	Ljungstrom & Van-Knapen, 1989
Barcelona, España	1989	1018	ELISA	3.6	Portus et al., 1989
Bogota, Colombia	1990	207	ELISA	43.6	Agudelo et al., 1990
Italia	1990	2583	ELISA	3.9	Genchi et. al, 1990
Sao Paulo, Brazil	1990	2025	ELISA	3.6	Chieffi et al., 1990
Baku, Rusia	1990	4765	HAI	12.5	Chobanov et.al., 1990
Dublin, Irlanda	1991	140	ELISA	52.1	Holland et al., 1991

---

Brazil	1991	54	ELISA	40.0	Virginia et al., 1991
Jordania	1992	699	ELISA	10.9	Abo-Shehada et al., 1992
Kuala Lumpur, Malasia	1993	331	ELISA	19.6	Hakim et al., 1993
Rep. Eslovaca	1993	908	ELISA	13.6	Havasiova et.al., 1993
Bali, Indonesia	1993	190	ELISA	63.2	Chomel et.al., 1993
Loire-Alantique, Francia	1994	1836	ELISA	22.0	Gueglio et al., 1994
Dublín, Irlanda	1995	2129	ELISA	3.1	Holland et al., 1995
Kathmandu Valley, Nepal	1996	200	ELISA	81.5	Rai et al., 1996
País Basco, España	1996	455	ELISA	3.1	Cilia et al., 1996
Islas Canarias, España	1997	14074	ELISA	3.4	Jimenez et al., 1997

---

Frecuencia de anticuerpos anti-Toxocara de humanos en diferentes lugares del mundo

Ellis et al., 1986;

ELISA = Inmunoensayo enzimático.

HAI = Hemoaglutinación indirecta.

O = Ouchterlony.

MP = Micropresipitación

## ***Larva migrans visceral***

Larva migrans visceral (LMV) es un síndrome clínico causado por la presencia y migración de larvas de diferentes nemátodos por los tejidos del humano. Estas larvas son de especies de parásitos no bien adaptadas al humano y por lo tanto no alcanzan el desarrollo completo en este hospedero accidental.

Fulleborn, en 1921, fue el primero en sugerir que larvas de nemátodos que afectan naturalmente a los animales podrían infectar a los humanos y causar enfermedad (citado por Glickman & Shofer, 1987). No fue sino hasta casi 30 años después cuando Mercer et al. en 1950 identificaron larvas de nemátodos ascaroideos en biopsias hepáticas de niños con un síndrome caracterizado por eosinofilia, hepatomegalia, infiltración pulmonar y silvidos (citado por Glickman & Shofer, 1987). En 1952, Beaver et al. identificaron que la causa de esta enfermedad eran larvas de *T. canis* y propusieron el término de *larva migrans visceral*. Desde entonces, y aunque se han identificado otras larvas de nemátodos como *Toxocara cati*, *Capillaria hepatica*, *Gnathostoma sp.*, *Ascaris suum* y *Ascaris lumbricoides*, que pueden dar signos parecidos en humanos, la mayoría de los autores consideran que *T. canis* es el nemátodo más frecuentemente involucrado en estos cuadros (Glickman & Schantz, 1979; Quiroz, 1988; Knapen et al., 1992).

En México el primer caso comprobado de Toxocariasis humana (LMV) fue informado en 1960 por Baez y Alemán, mediante examen histopatológico de una muestra de tejido hepático de una paciente de 7 años de edad.

Clinicamente, la gravedad de la enfermedad varía mucho según el número de huevos larvados ingeridos, la duración de la infestación, la presencia de larvas en lugares críticos y otros factores aun no entendidos (Beaver, et al., 1986). La mayoría de las infecciones humanas por *T. canis* cursan asintómicamente o con síntomas muy leves (Bass et al., 1987). El signo más notorio es la eosinofilia crónica. En algunos casos se han descrito cuentas de leucocitos de 30 000 a 100 000 por mm<sup>3</sup> y con 50 a 90% de eosinófilos (Beaver y col., 1952; Huntley y et al., 1965; Limaye y et al., 1990). Algunos estudios demuestran que las secreciones y excreciones de las larvas del parásito estimulan la producción de interleucina 5 que es la responsable de la eosinofilia (Coffman et al., 1989; Kusama et al., 1995; Sugane and Ohima, 1984; Yamaguchi et al., 1990). No obstante, la larva migrans

visceral es sólo una de las varias causas conocidas de eosinofilia en los humanos (Chisid y et al., 1975). En casos más graves se reportan historias de pica, fiebre, hepatomegalia, hiperglobulinemia y dolor abdominal. La mayoría de los pacientes se recuperan y sólo algunos llegan a morir (Dunn, 1983; Beaver et al., 1986).

En el hígado, la invasión larvaria causa una reacción del huésped con la formación de granulomas, la hepatomegalia parece ser una condición característica del padecimiento. Muchos pacientes registrados se han descubierto en biopsias indicadas por algún otro padecimiento (Dunn, 1983; Vortel et al., 1983; Beaver et al., 1986).

Clínicamente algunos pacientes presentan manifestaciones de inflamación pulmonar y tos (Markell et al., 1986), otros cursan sin manifestaciones pulmonares (Beaver et al., 1986). Se ha encontrado que pacientes con asma tienen más frecuentemente anticuerpos de la clase IgE que controles sin manifestaciones asmáticas (Dosowitz, 1981; Buijs et al., 1994; Lokman-Hakim et al., 1997). Algunos pacientes pueden presentar edema en nódulos linfoides sin otras manifestaciones (Amir et al., 1995).

Cuando las larvas alcanzan la circulación general pueden dirigirse a los riñones, en donde hasta ahora no se han detectado en la persona viva y solo hay reportes de autopsia en personas que murieron por otras causas (Dunn, 1983). Se ha discutido por varios autores el daño producido por larvas de *T. canis* en el Sistema Nervioso Central de humanos, mientras algunos han reportado diferentes problemas como: encefalitis, encefalopatías, ataxia y disturbios neurológicos (Moore, 1962; Schochet, 1967; Hill, 1985; Sommer et al., 1994; Lowichik & Ruff, 1995) otros no han encontrado ningún tipo de relación entre infección y patología nerviosa (Magnaval et al., 1997). En un estudio realizado por Huntley et al. en 1965, se encontró que en el 28% de los pacientes con LMV tenían antecedentes de convulsiones. Otros reportes parecen indicar que la infección por *T. canis* no se asocia frecuentemente a epilepsia (Glickman & Cypess, 1979; Woodruff et al., 1966). Además, se ha asociado la seropositividad a *T. canis* con bajo desarrollo de la inteligencia en niños (Nelson et al., 1996).

## *Larva migrans ocular*

La presencia y el daño producido por larvas de *T. canis* en el ojo determina una enfermedad conocida como *larva migrans ocular* (LMO). Este síndrome ocular fue descrito por primera vez por Wilder en 1950, quien encontró larvas de *T. canis* en 24 de 46 pseudogliomas en ojos enucleados por endoftalmitis con aparente retinoblastoma. Posteriormente se han reportado muchos casos similares (Wilder, H.C., 1950; Glickman et al., 1979; Glickman and Shofer, 1987; Small, et al., 1989; Liolet et al., 1992).

En 1966, fue informado por DeBuen y col. el primer caso de toxocariasis ocular en México, y se describió como una endoftalmitis por nemátodos. Se trató de una niña de 5 años de edad, a la cual se le registró por falta de agudeza visual y desviación del ojo izquierdo hacia afuera. Este caso tuvo gran importancia, ya que puso en evidencia la presencia del padecimiento en México. Más tarde en 1982, Equihua Hernández publicó un caso de toxocariasis en una niña de 9 años, a la cual se le diagnosticó atrofia óptica bilateral, como secuela de toxocariasis en el sistema nervioso.

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

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

Las lesiones detectadas en ojos han sido granulomas ubicados cerca del disco óptico o intrarretinales, retinocoroiditis posterior y periférica, panuveítis, papilitis óptica, uveítis, deformación o desprendimiento de retina, membranas idiopáticas epiretinales, infiltración de células inflamatorias en humor vítreo, lesiones hemorrágicas y neurorretinitis como secuela de migración de larvas en retina (Smith & Greer, 1971; Schantz et al., 1979; Gass & Braunstein, 1983; Sorr, 1984; Margo et al., 1986; Glickman, 1987; Glickman and shoffer, 1987; Mihara et al., 1993; Zygulska et al., 1993; Desai et al., 1996;). En la mayoría de los

casos las alteraciones solo ocurren en un ojo, aunque existen reportes de lesiones bilaterales (Matri-el et al., 1990; Benitez-del-Castillo et al., 1995).

## ANTÍGENOS DE EXCRECIÓN SECRECIÓN (Ag-SET)

En 1975, De Savigny desarrolló un método que con algunas modificaciones se sigue usando en la actualidad para la obtención de los antígenos de secreción excreción de las larvas de *T. canis* (Ag-SET). Para ello incubó larvas 2 de *T. canis* en medio mínimo esencial de Eagle con 1% de glucosa, de los sobrenadantes recolectó proteínas que fueron reconocidas antigénicamente por los hospederos. Diferentes autores han descrito modificaciones de estos medios de cultivo y han descrito diferentes antígenos de estos sobrenadantes.

El análisis de los Ag-SET en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y por Western Blot ha demostrado que estos antígenos son una mezcla compleja de glicoproteínas. Existen Ag-SET que han sido caracterizados por la mayoría de autores, sin embargo existen otros, que sólo han sido detectados por algunos autores. Lo anterior podría deberse a los diferentes medios en los que se cultivaron las larvas y a las técnicas que se utilizaron para la detección de los antígenos. Badley et al. en 1987 detectaron 15 bandas proteicas en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata. Las bandas fueron numeradas en orden decreciente de acuerdo al peso molecular (PM) y determinaron que las más abundantes son las bandas 10, 11 y 14 (76, 78 y 88 kDa respectivamente) seguidas por las bandas 1 y 3 (29 y 34 kDa). Pese a lo anterior, la mayoría de los autores están de acuerdo en que los Ag-SET más abundantes en lo sobrenadantes de los cultivos larvarios son de 32, 55, 70, 120 y 400 kDa de peso molecular (Maizels et al., 1984; Meghji & Maizels, 1986; Badley et al., 1987).

Los Ag-SET son glicoproteínas que presentan principalmente dos azúcares importantes la N-acetilgalactosamina y la galactosa, en menor abundancia otros como arabinol, manosa, N-acetilglucosamida, glucosa, fucosa y xilosa (Meghji & Maizels, 1986). Estos carbohidratos están presentes en diferentes proporciones en algunos o todos los Ag-SET formando epítomos que se encuentran ligados al complejo proteico del antígeno de manera fuerte o débil. Se han determinado ocho epítomos diferentes por medio de anticuerpos monoclonales, indicando que la respuesta inmunológica esta principalmente

dirigida hacia los complejos glicosilados de la molécula (Maizels et al., 1987). Entre las secreciones de las larvas en cultivo se han detectado además de glicoproteínas, algunos lípidos, pero contra estos no se monta una respuesta inmunológica y no se ha determinado cual es su papel biológico (Niedfeld et al., 1993).

Por Western blot se han determinado dos patrones de Ag-SET que son reconocidos por sueros humanos a los que se les llamó LMW (Low Molecular Weight) y HMW (High Molecular Weight). El patrón de HMW esta formado por bandas de 200, 147 y 132 kDa y el patrón LMW esta formado por bandas de 24, 28, 30 y 35 kDa (Magnaval et al., 1991). En varios estudios se ha demostrado que los antígenos de alto peso molecular pueden cruzar antigénicamente con antígenos de otros helmintos como: *Strongyloides sp.*, *Fasciola hepatica*, *Ascaris suum*, quiste hidatidico, *Toxascaris leonina*, *Ascaris suum*, *Schistosoma sp.* y *Oncocerca sp.* (Stevenson & Jacobs, 1977; Nicholas et al., 1984; Magnaval et al., 1991; Cuéllar et al., 1995). La fracción de bajo peso molecular presenta mayor especificidad hacia *Toxocara canis* que la fracción de alto peso (Magnaval et al., 1991).

En estudios utilizando anticuerpos monoclonales, se ha determinado que los dos sitios principales donde se encuentran los Ag-SET en las larvas, son las glándulas esofágicas y una larga rama de células columnares secretoras que desembocan a un poro excretor en el exterior de la larva, por la naturaleza de estos órganos dentro de la larva, se ha propuesto que en estos lugares se producen estos Ag-SET (Page et al., 1992b). Además, se ha encontrado que los antígenos de 32, 70 y 120 kDa están unidos a la cutícula de las larvas de *T. canis* (Page et al., 1992a). Por lo anterior, se ha propuesto que los Ag-SET son un importante mecanismo de inmuno-evasión del parásito, puesto que son las proteínas contra las que se monta principalmente la respuesta inmune y después estas se secretan al exterior del parásito (Maizels et al., 1984).

## MODELOS EXPERIMENTALES

Para el estudio de esta enfermedad se han utilizado como modelos experimentales varias especies de animales, entre ellas: ratones (Abo-Shelada & Herbert, 1984; Dunsmore et al., 1983; Ohima, 1961), ratas (Olson & Rose, 1966), monos (Tonimura et al., 1976),

conejos (Glickman & Shofer, 1987), pollos (Gavin, 1964; Agnihotri et. al, 1987; Maruyama et.al., 1994b), codornices (Nakamura et al., 1991; Maruyama et al., 1994a), hámster (Agnihotri et. al, 1987), cobayos (Buijs et al., 1995), cerdos (Stevenson & Jacobs, 1977) y jerbos (Flores-Alatorre, 1993). El modelo más utilizado es el ratón, ya que tiene grandes ventajas, como la de contar con cepas singénicas, haber sido ampliamente estudiados, su bajo costo, fáciles de mantener y reproducir. La toxocariasis tisular es fácil de inducir en los ratones, se han realizado estudios de distribución somática, inmunológicos y de patogenia (Lee et al., 1977; Holt et al., 1981; Dunsmore et al., 1983; Sugane & Oshima, 1983; Barriga & Myser, 1987; Parsons & Grieve, 1990; Havasiová-Reiterová et. al, 1995; Soltys et al., 1996). Sin embargo en los ratones la toxocariasis ocular no ocurre frecuentemente. Así mismo se han realizado estudios empleando los otros modelos experimentales con larvas migrantes en los tejidos, donde se han evaluado algunos aspectos de la patología o la respuesta inmune (Church et al., 1975; Stevenson & Jacobs, 1977; Glickman & Summers, 1983; Smith et. el., 1983).

En lo que se refiere a la relación huésped parásito a nivel ocular existe poca información, el reporte más relevante de esta relación fué hecho por Watzke y cols. en 1984, quienes inocularon directamente larvas de *T. canis* en humor vitreo, humor acuoso y coroides de macacos. La inoculación de las larvas produjo hemorragias retinales, perivasculitis, nódulos retinales, en algunos casos se observo una reacción inflamatoria producida por las larvas mientras que otros no indujeron tal efecto. La inoculación de medio de cultivo que contenía las proteínas de secreción excreción de larvas del parásito produjo vasculitis. Por ELISA se detectaron anticuerpos específicos contra *T. canis* en humor acuoso y humor vitreo. Por requerir cirugías especializadas y por el alto costo de los animales, este modelo no se ha usado para evaluar la patología o el tratamiento de la toxocariasis ocular. Por otro lado Alba y cols, 1984; Flores-Alatorre, 1993 reportaron la infección experimental en jerbos, en los cuales se presenta la toxocariasis ocular. Sin embargo no se realizaron en los jerbos estudios longitudinales de lesiones o estudios inmunológicos sistémicos u oculares.

# JUSTIFICACIÓN

*Toxocara canis* es uno de los nemátodos que se ha encontrado parasitando con mayor frecuencia a los perros de México y de muchas otras partes del mundo, afecta principalmente a cachorros y ocasionalmente a adultos (Cuadro 1 y Cuadro 2). La transmisión entre los perros es por la ingestión de huevos larvados o por la transmisión transplacentaria de perras a sus crías (Douglas y Beker, 1959; Olsen, 1974; Soulsby, 1982; Merck, 1988; Kirk, 1984).

Este parásito se transmite al hombre por la ingestión de huevos larvados de *T. canis* provenientes de la materia fecal de perros. Debido a la estrecha convivencia que existe entre el hombre y sus mascotas, existe una alta probabilidad de infección por lo que se ha considerado un problema de salud pública en muchos países del mundo.

En humanos se han reportado dos cuadros clínicos de toxocariasis: el síndrome de *larva migrans visceral* (LMV) y el síndrome de *larva migrans ocular*. El primero es producido cuando las larvas migran a través de los tejidos y el segundo cuando las larvas quedan enquistadas en los ojos.

El humano de hecho actúa como un hospedero paraténico de *T. canis*. En este, resulta de especial importancia conocer la migración de larvas, la evolución de lesiones histopatológicas y la respuesta inmune montada por los hospederos. Debido a la imposibilidad de realizar estos estudios en humanos, se ha propuesto el empleo de modelos experimentales en las que el parásito tenga un comportamiento similar. Para ello se han utilizado como modelos experimentales varias especies de animales, entre ellos: ratones (Abo-Shelada & Herbert, 1984; Dunsmore et al., 1983; Ohima, 1961), ratas (Olson & Rose, 1966), monos (Tonimura et al., 1976), conejos (Glickman & Shofer, 1987), pollos (Gavin, 1964; Agnihotri et al., 1987; Maruyama et al., 1994b), codornices (Nakamura et al., 1991; Maruyama et al., 1994a), hámster (Agnihotri et al., 1987), cobayos (Buijs et al., 1995), cerdos (Stevenson & Jacobs, 1977) y jerbos (Flores-Alatorre, 1993). El modelo más utilizado es el ratón en donde la toxocariasis sistémica es fácil de inducir, sin embargo, en ellos la toxocariasis ocular es muy rara.

Nuestro grupo, ha reportado infecciones experimentales en jerbos, en los cuales se presenta la toxocariasis ocular (Alba y col., 1994; Flores-Alatorre, 1993). Estos datos, aunque preliminares nos hicieron pensar que los jerbos podrían ser un modelo posible de toxocariasis ocular. Sin embargo, no existen estudios profundos de toxocariasis en estos animales. Por lo anterior, resulta importante realizar estudios longitudinales para observar la evolución de las lesiones en diferentes órganos y especialmente en los ojos. Estos datos, podrían compararse con los obtenidos de estudios en ojos humanos y se podrían relacionar las lesiones con la presencia de anticuerpos sistémicos y oculares. Además, el desarrollo de un modelo de toxocariasis ocular podría ser muy útil para el desarrollo y evaluación de nuevas formas de diagnóstico y de modelos farmacológicos, así como de la evolución de las lesiones sistémicas y oculares después de que se ha aplicado el tratamiento. Por lo anterior, en el presente trabajo se realizó un estudio integral de la toxocariasis en jerbos (*Meriones unguiculatus*), tanto ocular como sistémica.

# OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

- a) Determinar el potencial del jerbo (*Meriones unguiculatus*) como un modelo experimental para el estudio de la toxocariasis

## OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Estudiar el efecto de la inoculación de diferentes dosis de huevos larvados de *Toxocara canis* sobre la migración del parásito en órganos de jerbos a diferentes periodos.
- b) Encontrar una dosis que permita desarrollar el cuadro de *larva migrans visceral* y *larva migrans ocular* en los jerbos.
- c) Observar la evolución de las lesiones producidas por larvas de *Toxocara canis* en diferentes órganos de jerbos inoculados experimentalmente con el parásito.
- d) Evaluar los cambios hematológicos producidos en una inoculación experimental con *Toxocara canis*.
- e) Obtener y purificar antígenos de secreciones y excreciones de larvas de *Toxocara canis*.
- f) Evaluar la cinética de producción de anticuerpos séricos y oculares producidos contra antígenos de secreciones y excreciones de larvas de *Toxocara canis* en jerbos inoculados experimentalmente.
- g) Identificar los antígenos de secreciones y excreciones de larvas de *Toxocara canis* más frecuentemente reconocidos por jerbos inoculados experimentalmente con el parásito.

# MATERIAL Y METODOS

## Animales

En este estudio se utilizaron jerbos (*Meriones unguiculatus*) machos de 80 a 90 días de edad, de una línea singénica obtenida y mantenida en el bioterio del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Los animales fueron alimentados con alimento comercial para roedores y agua purificada *ad libitum*.

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

La obtención y cultivo de los huevos de *T. canis* se realizó modificando el método descrito por Ohima en 1961 y De Savigny en 1975. Se colectaron ejemplares adultos de *T. canis* a partir de necropsias realizadas a cachorros de entre uno y tres meses de edad, provenientes del Centro Antirrábico de Cuautitlán, Edo. de México. Las hembras se separaron y se extrajo el útero por una incisión en la parte media del cuerpo. Los úteros obtenidos de esta manera se colocaron en una caja de Petri y se extrajeron los huevos que se colocaron en una solución salina fisiológica, después con un colador fino se eliminaron restos y membranas del parásito. Los huevos se separaron por centrifugación (500 gs por 5 minutos a temperatura ambiente) desechando el sobrenadante por decantación, la masa de huevos sedimentados se re suspendió en una solución de formol al 2% (vol/vol) en agua y se incubaron en cajas de Petri estériles en una estufa bacteriológica a 25 °C, por 20 a 30 días para lograr el desarrollo de la larva 2 pasiva infectante. Al término del proceso se verificó la viabilidad de cada uno de los cultivos mediante la observación al microscopio compuesto del movimiento larvario.

## Obtención y cultivo de larvas

La obtención de larvas se realizó siguiendo el método desarrollado por DeSavigni en 1975 y modificado por Bowman y col. en 1987. Una vez cultivados los huevos y verificada su viabilidad por observación empleando microscopio optico, se procedió a lavarlos tres

veces por centrifugación y resuspensión, finalmente se resuspendieron en solución salina fisiológica 0.15% p/vol (SSF) esterilizada en autoclave. Posteriormente, en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar, se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 10 minutos, se lavaron 5 veces con RPMI 1640 al que se ha agregado HEPES para obtener un pH de 7.2 y se le añadió 100 ug/ml de gentamicina y 1% de glucosa p/vol . Los huevos larvados se sometieron a agitación en un agitador magnético por 25 minutos para producir la eclosión de los huevos. De la suspensión resultante se separaron las larvas viables por el método de migración larvaria de Baermann. Para ello se utilizaron microaparatos de Baermann estériles elaborados con pipetas Pasteur, a las cuales se les introdujo un algodón y fueron colocadas dentro de tubos de ensaye de 30 ml con tapa metálica sin sello hermético. La suspensión se colocó en la parte superior del algodón por dentro de la pipeta Pasteur y dentro del tubo se agregó medio de cultivo estéril hasta tocar el algodón por la parte inferior. Después de 24 horas de incubación a 37 °C en una estufa de CO<sub>2</sub> se colectaron del fondo del tubo de ensaye las larvas viables y se realizó una segunda colecta a las 48 horas. Las larvas recolectadas y resuspendidas en medio de cultivo RPMI-1640 fueron puestas en cajas de cultivo de 15 ml empleando una concentración de 1000 larvas/ml y se incubaron a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Las larvas cultivadas se utilizaron para la producción de Ag-SET.

## **Producción de Ag-SET**

El sobrenadante de las cajas de cultivo se colectó por aspiración en condiciones estériles dentro de la campana de flujo laminar, sedimentando primero a las larvas en un extremo de la caja por gravedad. Posteriormente se restituyó medio fresco a las cajas. El medio se reemplazó semanalmente (Maizels et al, 1984; Badley et al, 1987) y el sobrenadante se concentró 100 veces por ultrafiltración con un equipo Amicon y membranas de 10 000 D. La concentración final de proteínas fue determinada por una técnica de Lowry modificada por Dulley & Grieve (1975). Así mismo, se determinó la pureza y la integridad de los Ag-SET en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata (Merril et al., 1984).

## **Electroforesis de proteínas (SDS.PAGE)**

Para la caracterización del perfil de proteínas de los Ag-SET se utilizaron geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS). La separación de los componentes proteicos se llevó a cabo con algunas modificaciones por el método descrito por Laemli en 1970. El equipo utilizado fue una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN II electrophoresis cell (Bio-Rad Labs.)

Los Ag-SET fueron separados en geles de poliacrilamida de acuerdo al siguiente protocolo: El gel separador de aproximadamente 50 mm de largo fue preparado a una concentración de acrilamida del 12% en Trizma 0.375 M y pH de 8.8 . Se utilizó como gel concentrador un gel de aproximadamente 10 mm de largo, preparado con 4% de acrilamida en trizma 0.125 M y 6.8 de pH. Los geles se prepararon en placas de vidrio con separadores de 1 mm de grosor. La solución amortiguadora de corrimiento utilizada consistió de una solución de Trizma base 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0.1% (p/vol), a un pH de 8.3 .

Las muestras se diluyeron 1:1 un una solución amortiguador de muestra a pH de 6.8 (Trizma base 62.5 mM, SDS 2%, glicerol 10%, Azul de bromofenol 0.002% y 2-mercaptoetanol 5%). Las muestras se calentaron en baño María en ebullición durante 5 minutos. En cada corrimiento se incluyeron marcadores de peso molecular (MPM) preteñidos (Bio-Rad) y una vez que transcurrió este tiempo las muestras se colocaron en el gel y se corrieron a 150 V con 120 mA para el gel concentrador por 10 min. y a 70 mA para el gel separador hasta que el frente del colorante migró al borde inferior del gel (Hames & Rickwood, 1981). Una vez terminado el corrimiento, las proteínas separadas en los geles se transfirieron a papel de nitrocelulosa o fueron teñidos con nitrato de plata (Merril et al., 1984). El PM de los Ag-SET obtenidos fueron determinados por medio de una curva patrón, realizada graficando el logaritmo del PM de los marcadores preteñidos, contra su migración a través del gel expresada en centímetros (Bjerrum, 1988). Los MPM fueron: miosina 203 kDa; beta-galactosidasa 118 kDa; albúmina sérica bovina 86 kDa; ovoalbúmina 51 kDa; anhidrasa carbónica 34 kDa; inhibidor de la tripsina 29 kDa; lisozima 19 kDa y aprotinina 7.5 kDa.

## **Transferencia de Ag-SET a papel de nitrocelulosa**

Para llevar a cabo la transferencia de proteínas se utilizó un equipo Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell para electrotransferencia semiseca que consta de dos platos electrodos de carbón. Para ello se cortaron piezas de papel de nitrocelulosa al tamaño de los geles de poliacrilamida y ambos se colocaron entre capas de papel filtro Watman 0.2  $\mu\text{m}$  remojados en un buffer especial de transferencia (25mM Tris, 192 mM glicina, 0.05% SDS p/vol, 20% metanos vol/vol) y cortados al mismo tamaño del gel. Los antígenos separados por electroforesis se transfirieron a 12 V con una corriente de 0.8 mA/cm<sup>2</sup> por un tiempo de 35 minutos (Bio-Rad manual, 1996).

La transferencia de los Ag-SET fue verificada por la presencia en el papel de los marcadores de peso molecular preteñidos y con una tinción reversible de rojo de Ponceau, sumergiendo el papel en el colorante por 5 minutos, una vez que aparecieron las bandas más prominentes se lavaron los papales con agua destilada. El resto de la membrana fue bloqueado con Tris-Buffer Salino (HCl 0.15 M, Tris-HCl 20 mM, pH 7.5) con 5% de leche descremada en polvo a 4 °C por toda la noche (Bjerrum, 1988; Salinas, 1995).

## **Western-blot**

Una vez obtenidos los Ag-SET en el papel de nitrocelulosa, este se cortó en tiras de 5 mm de ancho y se lavaron tres veces en Tris-Buffer Salino (TBS). Las membranas lavadas se incubaron en agitación constante, por 2 horas a temperatura ambiente con los sueros de los jerbos diluidos 1:1000 en TBS + 0.02% de Tween 20 vol/vol + 5% de leche descremada p/vol. Posteriormente, las membranas se lavaron 5 veces por 5 min. con TBS + 0.02% de Tween 20. Las membranas lavadas se incubaron en agitación constante, por 2 horas a temperatura ambiente con los sueros de conejos anti-jerbos diluidos 1:500 en TBS + 0.02% de Tween 20 + 5% de leche descremada. A continuación, se lavaron nuevamente las membranas 5 veces por 5 min. con TBS-Tween. La tercera incubación de las membranas se realizó en agitación constante, por una hora a temperatura ambiente con un conjugado anti-conejo marcado con fosfatasa alcalina y preparado en borrego (marca serotec) diluido 1:2000 en TBS-Tween + 5% leche descremada. Posteriormente, las membranas se lavaron

5 veces por 5 min. con TBS + 0.02% de Tween 20 y una vez más con TBS sin Tween. La última incubación se realizó con los substratos NBT (Nitroblue tetrazolium) y BCIP (5-Bromo-4-Cloro-3-indolil fosfato), diluidos en una solución amortiguadora de fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM). Cuando se hizo evidente la reacción por la aparición de bandas de color café se lavaron las membranas con agua destilada y se secaron sobre un papel filtro (Bjerrum, 1988).

### **Purificación de gammaglobulinas de jerbos**

La purificación de gammaglobulinas de jerbo (GGJ) se realizó con algunas modificaciones de acuerdo al método descrito por Garvey y col. en 1977 y Nowotny en 1979.

Para ello a 200 ml de suero de jerbos aparentemente normales se les adicionaron lentamente y en agitación constante 100 ml de una solución sulfato de amonio saturada y se ajustó el pH a 7.8 con una solución de NaOH 2N. La agitación se continuó por 3 horas y la solución se centrifugó a 4 °C por 30 minutos a 1400 X gs, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en solución salina a pH 7.8 hasta alcanzar el volumen inicial del suero (200 ml) y en seguida se adicionaron lentamente 100 ml de la solución de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> saturada, la centrifugación y resuspensión se repitió 4 veces. El sedimento de la última centrifugación se disolvió en una solución amortiguadora de boratos hasta alcanzar 100 ml, se dializó (membrana de 100 kDa esta solución contra una solución salina amortiguadora de boratos a 4 °C por 5 días. Después de completar la diálisis se sacó la muestra se centrifugó por 30 minutos a 1400 X g., al sedimento se le determinó la cantidad de proteína por la técnica de Lowry modificada por Dulley & Grieve (1975) y la pureza de las inmunoglobulinas se comprobó por electroforesis en geles de poliacrilamida.

### **Producción de suero de conejo antigamma globulinas de jerbo**

Para la obtención de suero de conejo antigamma globulinas se empleó la técnica descrita por Morilla y Bautista en 1986 con algunas modificaciones. En esta se utilizaron 2

conejos machos de un año de edad, el día 0 se les inoculó subcutáneamente 5 mg de GGJ disueltas en 1 ml de solución salina estéril, emulsificada con 1 ml de adyuvante completo de Freund. El día 15 se repitió la inoculación empleando adyuvante incompleto de Freund. El día 30 se aplicó intramuscularmente 1 mg de GGJ en solución salina. Los animales se sangraron por punción cardíaca una semana después de la última inmunización y se titularon los sueros obtenidos por una técnica de ELISA.

### **Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para suero de conejo antigammaglobulinas de jerbo**

El ELISA se realizó con el objeto de titular dos sueros de conejo antigamma de jerbo y Ag-SET para ser utilizado posteriormente en otros inmunoensayos. Las pruebas se realizaron de acuerdo la técnica descrita por Coligan et al. en 1994 con algunas modificaciones.

Las pruebas se realizaron por triplicado y se repitió dos veces el ensayo. En estos Ag-SET se acopló a placas de fondo plano de poliestireno (Nunc) con 50 µl de 3 diferentes diluciones del antígeno (5, 10 y 20 µg/ml) en una solución amortiguadora de fosfatos con azida de sodio con pH de 7.6 e incubando a 4 °C por toda la noche. Posteriormente se lavaron los pozos tres veces con agua bidestilada y los sitios libres fueron saturados al llenar los pozos con solución de bloqueo ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{H}_2$  0.77 M, NaCl .012 M, Tween 20 0.05% vol/vol, EDTA 1 mM, albúmina sérica bovina 0.25% p/vol,  $\text{NaN}_3$  0.05% p/vol a pH 8.5) e incubándose 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas tres veces con agua bidestilada. A continuación se agregaron 50 µl. de 4 diferentes diluciones de los sueros de conejo antigammaglobulina de jerbo (1:500, 1:100, 1:50 y 1:20) en solución de bloqueo y las placas se incubaron por dos horas. Nuevamente las placas se lavaron tres veces con agua bidestilada y se incubaron por 2 horas con 50 µl. de una dilución de 1:2000 de conjugado de IgGs de borrego anti-IgGs de conejo marcado con fosfatasa alcalina y preparado (marca Serotec). Después de lavar tres veces con agua bidestilada se agregaron 75 µl. de sustrato p-nitrofenilfosfato 3 mM,  $\text{NaCO}_3$  0.05 M,  $\text{MgCl}_2$  0.5 mM (NPP), y se

incubaron por una hora a temperatura ambiente, la reacción se paró con 25  $\mu$ l de NaOH 0.5 N. Los pozos fueron leídos en un lector de ELISA (Bio-Rad) a 405 nm.

### **ELISA para evaluar los títulos de anticuerpos anti-Ag-SET en suero de jerbos experimentalmente infectados**

Con el objetivo de evaluar los títulos de anticuerpos anti-Ag-SET en suero y líquido intraocular de jerbos inoculados experimentalmente con larvas de *T. canis*. Se realizó el ELISA de acuerdo con el método descrito por Coligan et al. en 1994 con algunas modificaciones.

Las pruebas se hicieron por triplicado y se repitió dos veces el ensayo. Se sensibilizaron las placas de fondo plano de poliestireno (Nunc) con 50  $\mu$ l. de una dilución 10  $\mu$ g/ml del Ag-SET en una solución buffer de fosfatos con azida de sodio con pH de 7.6 e incubando a 4 °C por toda la noche. Posteriormente se lavaron los pozos tres veces con agua bidestilada y los sitios libres fueron saturados al llenar los pozos con solución de bloqueo ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{H}_2$  0.77 M, NaCl .012 M, Tween 20 0.05%, EDTA 1 mM, albúmina sérica bovina 0.25%,  $\text{NaN}_3$  0.05% a pH 8.5) y se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con agua bidestilada. A continuación se agregaron 50  $\mu$ l. de 3 diferentes diluciones (1:500, 1:1000 y 1:2000) de los sueros de jerbos inoculados con 1000 huevos larvados de *T. canis* en solución de bloqueo y se incubaron por dos horas. Nuevamente se lavaron tres veces con agua bidestilada. Posteriormente se agregaron 50  $\mu$ l. de una dilución 1:500 de un suero de conejo anti-gammaglobulinas de jerbo en solución de bloqueo y se incubaron las placas por dos horas. Nuevamente se lavaron éstas tres veces con agua bidestilada y se incubaron por 2 horas con 50  $\mu$ l. de una dilución de 1:2000 de conjugado de IgGs de borrego anti-IgGs de conejo marcado con fosfatasa alcalina y preparado en borrego (Serotec). Después de lavar tres veces con agua bidestilada se agregaron 75  $\mu$ l. de substrato NPP y se incubaron por una hora a temperatura ambiente, la reacción se paró con 25  $\mu$ l de NaOH 0.5 N. Los pozos se leyeron en un lector de ELISA a 405 nm.

Para la evaluación de los títulos de anticuerpos anti-Ag-SET en líquido intraocular se siguió el mismo procedimiento anterior, pero las diluciones del líquido intraocular fueron 1:20 y 1:50 para los jerbos inoculados y 1:20 para los jerbos control.

### **Biometría hemática**

Con el objetivo de llevar a cabo los ensayos de biometría hemática se puncionó el corazón en el momento del sacrificio de los jerbos. Se utilizaron jeringas y agujas estériles y la muestra se depositó en tubos Ependorf estériles, los cuales contenían ácido etilendiamino-tetracético (EDTA) en dilución al 10% y a dosis de 1 gota por ml de sangre.

Se obtuvieron aproximadamente 2 ml de sangre de cada animal, cantidad suficiente para realizar la biometría hemática. Una vez obtenida la muestra se hizo la identificación y se mantuvieron en refrigeración a 4 °C.

El frotis sanguíneo se realizó inmediatamente al llegar al laboratorio. Se colocó una gota de sangre en un portaobjetos y con otro portaobjetos colocado en un ángulo de 30° se corrió por capilaridad la sangre hacia un extremo. Una vez hecha la película para el frotis se fijó con metanol durante tres minutos, para posteriormente teñirla con colorante de Wright (Medway, 1969).

El conteo diferencial de células se llevó a cabo observando el frotis con un microscopio óptico y el objetivo de inmersión (100x), identificándose las células blancas hasta contar un total de 100. Las células que se identificaron fueron polimorfo nucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y células mononucleares. El resultado final se obtuvo en porcentaje, mientras que los valores absolutos se obtuvieron de multiplicar el porcentaje por el número total de leucocitos en cada animal. Para la identificación de las células se utilizaron descripciones clásicas de la literatura (Schalm, 1975; Ióvine y Selva, 1979; Woodliff y Herrmann, 1981).

Para evaluar número total de leucocitos se diluyó la sangre 1:20 en líquido de Turk (Solución de ácido acético al 2% y una pequeña cantidad de azul de metileno) en una pipeta mezcladora, por capilaridad se depositó la dilución en una cámara de Neubauer y se contaron los leucocitos contenidos en los 4 cuadrados angulares y se multiplicaron por 50,

el resultado final es obtenido en miles de leucocitos por microlitro de sangre (Medway, 1969; Ióvine y Selva, 1979),

La determinación de la hemoglobina se midió por el método de la cianometahemoglobina. En un tubo con 5 ml de solución de Drabkin (Bicarbonato de sodio 0.1%, Cianuro de potasio 0.005% y Ferricianuro de potasio 0.02 %) se agregaron 20  $\mu$ l de sangre. Se dejó reposar 10 minutos para que se formara la cianometahemoglobina, transcurrido este tiempo se leyó en un espectrofotometro con filtro de 540 nm, se ajustó previamente con un blanco y se calculó una curva patrón de una solución de hemoglobina de concentración conocida (Ióvine y Selva, 1979).

### **Infección experimental**

Para la inoculación de los jerbos inicialmente se cuantificó el número de huevos larvados viables. El criterio para determinar un huevo viable fue observar la larva bien formada dentro del huevo y con movimiento. Para cuantificar el número de huevos larvados en un cultivo se empleó la técnica descrita por Oshima en 1961 con algunas modificaciones. En ésta se lavaron los huevos de un cultivo por concentración y resuspensión en 50 ml de PBS. Enseguida se tomaron 5 muestras de 20  $\mu$ l de la resuspensión y se contó el número de huevos viables en cada muestra, se obtuvo un promedio de estas muestras y se multiplicó por 50, el resultado fue el número de huevos viables por ml de resuspensión. Posteriormente se agregó suficiente PBS para obtener una concentración final de 2500 huevos por ml.

Con el fin de eliminar probables infecciones por helmintos intestinales o protozoarios, 15 días antes de ser inoculados con huevos de *T. canis*, todos los animales fueron tratados mediante sondeo intragástrico, por tres días seguidos empleando metronidazol a dosis de 200 mg/Kg y 20 mg/Kg de mebendazol.

La inoculación se realizó con una sonda metálica para sondeo intragástrico en ratas, las diferentes cantidades de huevos inoculados se diluyeron en 0.4 ml de PBS.

## **Protocolo experimental para la evaluación de cinética de distribución somática de larvas de *T. canis* en jerbos (*Meriones unguiculatus*)**

En este estudio se utilizaron 180 jerbos (*Meriones unguiculatus*) divididos en 4 grupos, tres de ellos con 50 jerbos y un cuarto con 30 jerbos. Los jerbos del grupo 1 se inocularon con 200 huevos larvados de *T. canis* (hlTc) suspendidos en 0.4 ml de SSF. Los del grupo 2 se inocularon con 1000 hlTc suspendidos en 0.4 ml de SSF. Los del grupo 3 se inocularon con 5000 hlTc suspendidos en 0.4 ml. de SSF. Los jerbos del grupo 4 sólo recibieron 0.4 ml de SSF y se utilizaron como grupo testigo.

Se sacrificaron por inhalación con cloroformo 5 jerbos de cada grupo inoculado y 3 del grupo control a diferentes períodos (12 horas y a los días 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40 y 60 post-inoculación). Una vez sacrificados los animales se les extrajeron por separado los diferentes órganos que incluyeron: Hígado, corazón; riñones, esófago, estómago, intestino, pulmones, bazo, testículos, piel, cerebro, ojos y el resto se considero carcaza. Cada uno de estos órganos se cortó por separado en pequeños fragmentos, se colocaron en tubos de ensaye que contenían una solución de pepsina al 1% p/vol y HCl al 1% vol/vol y se incubaron a 37 °C por 24 horas. Posteriormente los tejidos digeridos se centrifugaron a 600 gs, se retiró el sobrenadante, se agregaron al sedimento algunas gotas de formol al 10% y se contó el número total de larvas utilizando un microscopio óptico de luz.

En el momento del sacrificio, los jerbos fueron pesados y al realizar la necropsia se pesaron en forma independiente cada uno de los diferentes órganos colectados. Además se tomó sangre de cada animal para las pruebas de biometría hemática.

Con el objeto de evaluar la reproducibilidad de la infección experimental que se llevo a cabo en el segundo experimento, en el se utilizaron 30 jerbos divididos en 2 grupos de 15 animales cada grupo. El grupo 1 se inoculó con 1000 hlTc y el grupo 2 con 5000 hlTc suspendidos en 0.4 ml. de SSF. Posteriormente se sacrificaron los jerbos por inhalación con cloroformo 5 jerbos de cada grupo a diferentes períodos (5, 20 y 60 días post-inoculación). Una vez sacrificados los animales se les extrajeron por separado los mismos órganos que el experimento anterior y se procesaron de la misma manera.

## **Protocolo experimental para de la evaluación de las lesiones producidas por larvas de *T. canis* en jerbos experimentalmente infectados**

Con el objeto de evaluar las lesiones producidas por larvas de *T. canis* en jerbos, se utilizaron 45 animales que fueron inoculados intragastricamente con 1000 huevos larvados de *T. canis* en 0.4 ml de SSF. Como testigo se utilizó un grupo de 6 jerbos a los cuales sólo se les aplicó intragastricamente 0.4 ml de SSF.

Se sacrificaron por inhalación con cloroformo 5 animales del grupo inoculado a diferentes periodos (0.5, 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40 y 60 días p.i.). En estos días se extrajeron por separado diferentes órganos que incluyeron: hígado, pulmones, riñones, bazo, esófago, estómago, intestino, tejido muscular, testículos, cerebro y ojos, se describieron las lesiones macroscópicas en cada uno de ellos. Posteriormente todos los órganos excepto testículos, se fijaron en una solución de formol al 10% en PBS, los testículos se fijaron en una solución de Bowin. Las muestras tomadas se deshidrataron e incluyeron en parafina, una vez incluidas se realizaron cuando menos 10 cortes histológicos de cada tejido y 20 en cada ojo. Los cortes fueron teñidos con una coloración de hematoxilina-eosina (Luna, 1968). Así mismo se realizaron algunos cortes extras de riñón que fueron teñidos con la coloración de ácido peryódico de Shiff (P.A.S.)

## **Protocolo experimental para evaluar la respuesta de anticuerpos en una infección experimental por larvas de *T. canis* en jerbos**

Con el objetivo de evaluar la evolución la respuesta de anticuerpos producida por larvas de *T. canis* en jerbos, se utilizaron 35 animales, los cuales fueron inoculados intragástricamente con 1000 huevos larvados de *T. canis* en 0.4 ml de SSF. Esta dosis se considero la más adecuada para obtener una infección por vía intragástrica. Como control se utilizó un grupo de 35 jerbos a los cuales sólo se les aplicó intragástricamente 0.4 ml de SSF. Cinco animales del grupo inoculado y 5 del grupo control se sacrificaron por inhalación con cloroformo a los días 5, 10, 20, 30, 40, 60 y 130. En estos días se obtuvo también sangre por punción cardiaca y líquido intraocular por punción de ojos. Una vez obtenidas las muestras se midieron por técnica de ELISA los títulos de anticuerpos contra Ag-SET en suero y líquido intraocular. Así mismo se identificaron por Western blot

los Ag-SET reconocidos por anticuerpos generados por la respuesta inmune de los animales inoculados con el parásito.

### **Análisis estadístico**

Con el objetivo de comparar los valores obtenidos en cuanto al número total de larvas recuperadas entre los grupos, el número de larvas recuperadas en cada órgano en cada grupo y hacer una comparación del número de larvas recuperadas en los diferentes órganos en un determinado día en cada grupo, se utilizaron una prueba de análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de TUKEY que calcula la diferencia mínima significativa honesta (Hurley y col., 1981). La misma prueba se utilizó para comparar las densidades ópticas obtenidas en la determinación de anticuerpos contra Ag-SET en grupos de jerbos inoculados con hITc y grupos de jerbos control por la prueba de ELISA.

El número de leucocitos sanguíneos (linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y monocitos) en una población sana presenta una distribución normal, en estas se puede calcular el intervalo de confianza ( $p < 0.05$ ) agregando a la media, más menos dos veces la desviación standard. Cualquier punto por fuera de esta franja en una gráfica es diferente estadísticamente a la media de los normales con una confianza del 95% (Daniel, 1974; Cartas-Chiñas, 1987).

# RESULTADOS

## **Cinética de migración de larvas de *T. canis* en jerbos inoculados intragástricamente con diferentes cantidades de hITc.**

La cinética de migración se evaluó contando el número total de larvas recuperadas después de una digestión artificial en los tres grupos, inoculados con 200, 1000 y 5000 hITc, los resultados se presentan en los cuadros 4, 6 y 8 y en las gráficas 1, 3 y 5.

La administración de las diferentes dosis de huevos larvados de *T. canis* en los jerbos indujo la infección en todos los animales inoculados (Cuadros 4, 6, y 8). No se recuperaron larvas en ninguno de los animales a los que se les administró únicamente solución salina fisiológica.

Los resultados obtenidos mostraron que, independientemente de la dosis de inoculación se recuperaron larvas en los diferentes órganos de los jerbos de los tres grupos, pero se presentaron diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) en el total de larvas recuperadas entre los grupos como se muestra en los cuadros 4, 6 y 8. En éstas, se observa que a mayor número de larvas administradas mayor el número de larvas recuperadas. La cinética de migración de las larvas en los tres grupos guarda muchas similitudes aunque la cantidad de larvas es diferente.

La cantidad total de larvas recuperadas el día 1 p.i. es menor que la cantidad de larvas recuperadas en los otros días p.i.. Este fenómeno se presentó en los tres grupos inoculados.

En los tres grupos, a las doce horas post-inoculación (p.i.) el intestino presentó estadísticamente la mayor cantidad de larvas ( $p < 0.05$ ), posteriormente a las 24 y 72 horas p.i. la cantidad de larvas descendió rápidamente en este lugar y desapareció prácticamente el día 5 p.i..

El corazón y los riñones fueron los órganos en los que se recuperó el mayor número de larvas en el grupo inoculado con 200 hITc a los 3 días p.i., posteriormente el día 5 p.i. el número de larvas recuperadas en estos órganos descendió y aumentó el número de larvas en la carcasa, hígado y pulmones. Entre los días 5 y 60 p.i. la carcasa fue el lugar en donde

mayor número de larvas se recuperó en este grupo. Entre los días 30 y 60 el segundo órgano en donde mayor cantidad de larvas se recuperó fue el cerebro (cuadro 4 y gráfica 1).

En los grupos inoculados con 1000 y 5000 hITc los pulmones y el hígado fueron los órganos de donde se recuperó el mayor número de larvas los días 3 y 5 p.i., posteriormente el número de larvas desciende en estos órganos aunque se mantiene en pequeñas cantidades hasta el día 60 p.i.. Entre día 10 y 60 p.i. el mayor número de larvas se recuperó de la carcaza y el segundo órgano con mayor cantidad de larvas fue el cerebro (cuadro 6 y 8, gráfica 3 y 5). En estos grupos, a partir del día 5 y hasta el día 60 se recuperaron pequeñas cantidades de larvas en ojos (cuadro 6 y 8).

En ninguno de los grupos y a los tiempos en que se sacrificaron los animales se recuperaron larvas de bazo, esófago o estómago. En el grupo inoculado con 5000 hITc se recuperaron algunas larvas en testículos entre los días 30 y 60 p.i. (cuadro 8), sin embargo esto no se observó en los jerbos inoculados con cantidades menores de larvas.

En los jerbos inoculados con 1000 y 5000 hITc se detectaron en forma constante pequeñas cantidades de larvas en ojos entre los días 5 y 60 p.i.. En el grupo inoculado con 200 hITc sólo se detectaron algunas larvas en ojos los días 30 y 60 p.i..

En los cuadros 10 y 11 se presentan los resultados de un segundo experimento en el cual se inocularon con 1000 y 5000 hITc dos grupos de 15 jerbos cada uno grupo. Después de sacrificar 5 jerbos de cada grupo a los días 5, 20 y 60 p.i., se contó el número total de larvas en cada órgano. No se encontraron diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre el número de larvas recuperadas en estos grupos y la cantidad de larvas recuperadas en los grupos anteriores a los mismos días de sacrificio.

### **Determinación de la concentración de larvas de *T. canis* en órganos de jerbos inoculados con diferentes cantidades de hITc.**

Otra forma en que se analizó la migración larvaria fue determinar la concentración de larvas por gramo de órgano muestreado, para ello se pesó en el momento del sacrificio cada órgano por separado, el número de larvas recuperadas se dividió entre el peso del órgano y de esta manera se obtuvo la concentración de larvas por gramo en cada

órgano. Los resultados de este análisis se presentan en los cuadros 5, 7 y 9 y en las gráficas 2, 4 y 6.

En los tres grupos la mayor concentración de larvas a las doce horas se presentó en intestino, la concentración de larvas en este órgano disminuyó a las 24 y 72 horas y desapareció a los 5 días. En pulmones se presentó la mayor concentración de larvas en los jerbos de todos los tratamientos a los tres días p.i. y disminuyó en días posteriores. En el hígado la mayor concentración de larvas se presentó el día 3 para los dos primeros grupos (inoculados con 200 y 1000 hlTc) y el día 5 para el grupo inoculado con 5000 hlTc y disminuyó la concentración en días posteriores. Otro órgano que alcanzó una alta concentración de larvas fue el corazón, entre los días 3 y 5 se presentó la mayor concentración de larvas en este órgano en los diferentes grupos (cuadro 5, 7 y 9).

La carcaza es el tejido del cual se recuperaron la mayor cantidad de larvas en los diferentes grupos entre los 10 y 60 p.i., pero la concentración de larvas en este lugar es baja en estos días. El lugar en donde la concentración de larvas fue mayor entre los días 30 y 60 p.i. fue el cerebro.

DÍAS P.I.	0.5	1	3	5	10	20	30	40	60
MÚSCULO	0	0	8.8 ± 2.3	24	41.4 ± 9.2	52	55	59.2 ± 7.4	66 ± 5.47
CORAZÓN	0	1 ± 1.73	36.6 ± 9.7	7.4 ± 6.2	6.8 ± 3.1	6.4 ± 2.19	3.8 ± 4	0	0.4 ± 0.89
PULMONES	3.8 ± 4	0	13.8 ± 3.9	16 ± 4.6	11.2 ± 3.4	7.8 ± 5	0	0.6 ± 0.89	0
HÍGADO	0	3.4 ± 2.3	0	20 ± 8.6	15.2 ± 4.7	15.6 ± 4.4	0	0	0
IRÑONES	0	0	17.2 ± 5.4	12.8 ± 1.4	1.6 ± 1.8	0	4.5 ± 3.63	0	0
INTESTINO	102 ± 19	51.2 ± 15.9	0	0.8 ± 1.3	0	0	0	0	0
PIEL	0	0	0	1.6 ± 2.9	0	0	0	0	0
OJOS	0	0	0	0	0	0	0.4 ± 0.54	0	0.4 ± 0.89
CEREBRO	0	0	0	2.8 ± 2.16	0.6 ± 1.34	6.2 ± 2.58	15.4 ± 3.2	15.2 ± 4.7	12.2 ± 8.3
TESTÍCULO	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BAZO	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ESÓFAGO	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ESTÓMAGO	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	105.8 ± 18	65.8 ± 15.9	50.4 ± 14	84.8 ± 9.3	76 ± 12.8	88.2 ± 8.3	79.5 ± 4.86	75 ± 9.08	79 ± 9.53

Cuadro 4.- Número de larvas recuperadas en tejidos de jerbos sacrificados a diferentes periodos después de la inoculación intragástrica con 200 huevos larvados de *Toxocara canis*. Cada dato representa la media y desviación standard de 5 animales.

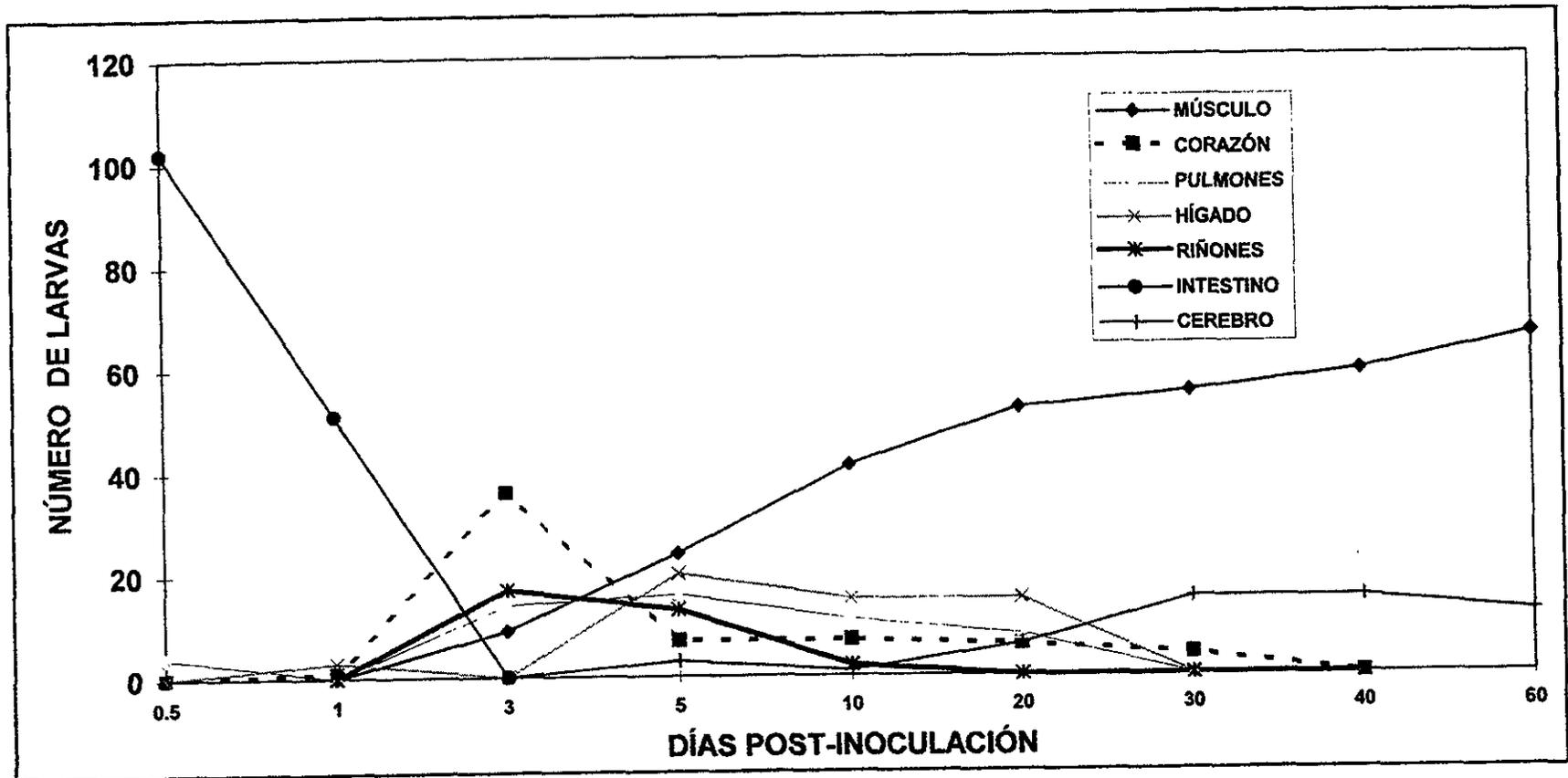


Figura 1.- Número de larvas recuperadas en diferentes tejidos de jerbos sacrificados a diferentes periodos después de la inoculación intragástrica con 200 huevos larvados de *Toxocara canis*. Cada punto representa la media y desviación standard de 5 animales.

DÍAS P.I.	0.5	1	3	5	10	20	30	40	60
CORAZÓN	0	3.3	29.3	24.66	20.6	19	12.83	0	1.53
HÍGADO	0	0.5	6.9	10.05	5.54	6.5	0	0	0
PULMONES	1.94	0	43.05	18.82	12.3	8.24	0	0.64	0
RIÑONES	0	0	0	20.31	2.35	0	6.3	0	0
INTESTINO	20.4	10.24	3.44	0.05	0	0	0	0	0
CEREBRO	0	0	0	2.74	0.63	5.8	15.15	16.81	14.18
MÚSCULO	0	0	0	0.73	1.2	1.61	1.34	1.74	1.94
PIEL	0	0	0	0.16	0	0	0	0	0
OJOS	0	0	0	0	0	0	0.75	0	0.75
BAZO	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TESTICULO	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ESÓFAGO	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ESTÓMAGO	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Cuadro 5.- Número de larvas recuperadas por gramo de tejido a diferentes periodos después de la inoculación intragástrica con 200 huevos larvados de *Toxocara canis*. Cada dato representa la media y desviación standard de 5 jerbos.**

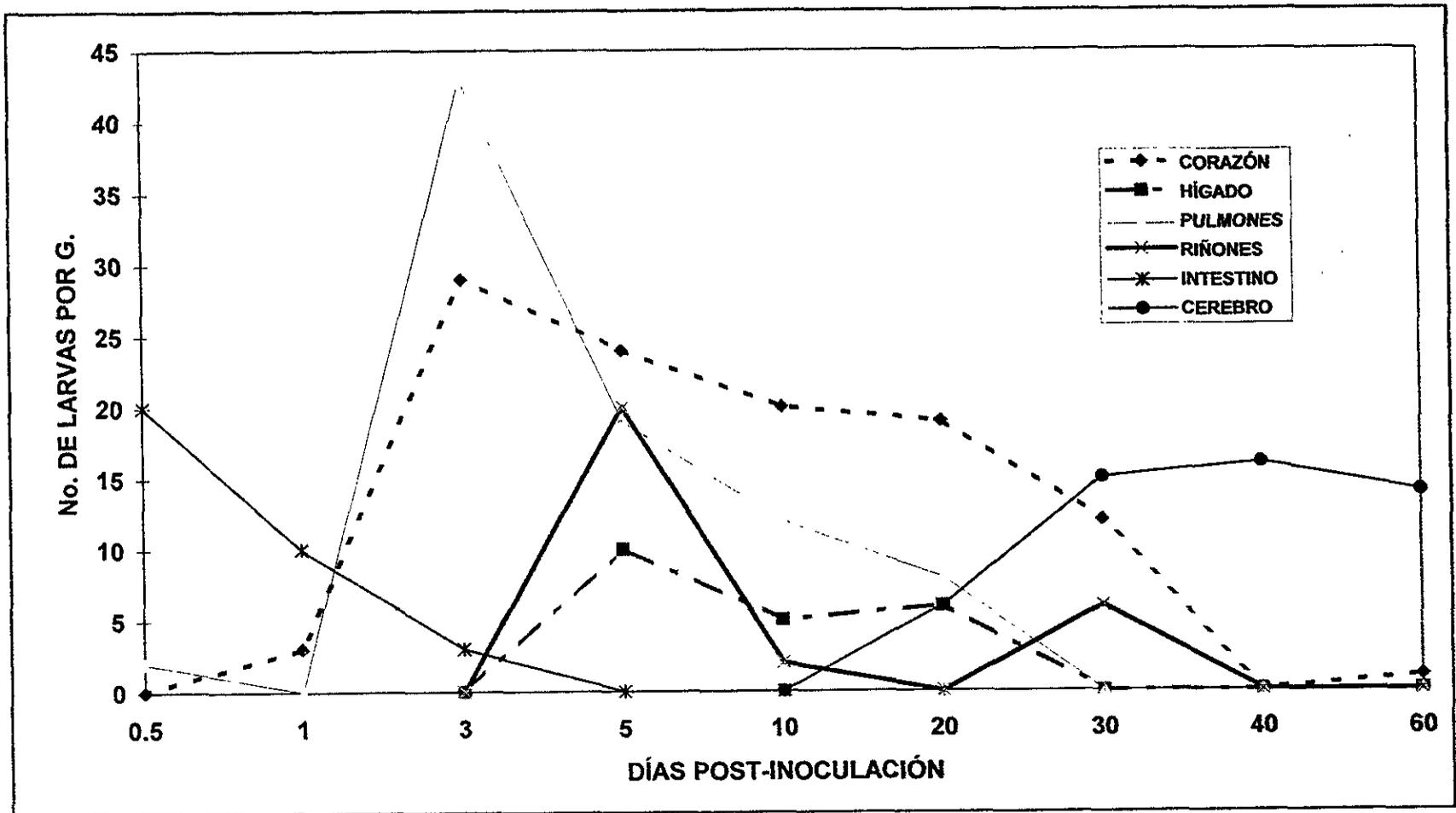


Figura 2.- Número de larvas recuperadas por gramo de tejido a diferentes periodos después de la inoculación intragástrica con 200 huevos larvados de *Toxocara canis*. Cada punto representa la media de 5 animales.

DÍAS P.I.	0.5	1	3	5	10	20	30	40	60
MÚSCULO	0	0	0	5.4	400 ± 10	524 ± 30	600	680	558 ± 40
CORAZÓN	0	0	0	25.6 ± 4	16 ± 2.7	3.2 ± 3.4	11.4 ± 2.8	7.8 ± 2.3	1 ± 1.5
PULMÓN	10 ± 6.4	31.5 ± 8.8	390 ± 72.1	197 ± 65.5	94 ± 16.9	16.4 ± 3.4	14 ± 1.26	5 ± 1.5	2 ± 2.5
HÍGADO	8 ± 7.7	59 ± 13.1	91.8 ± 7.6	131 ± 19.5	98 ± 10.6	69.8 ±	2.5 ± 1.6	10.2 ± 3.3	3 ± 1.7
RIÑONES	0	0	17 ± 5	61.6 ± 6.3	27.2 ± 6.1	7.4 ± 5.2	16.8 ± 4.1	19.6 ± 6.1	5.2 ± 3.4
INTESTINO	538 ± 132	142 ± 34	14 ± 7.2	2.8 ± 3.9	0	0	0	0	0
PIEL	0	0	0	6.2 ± 4.8	0.8 ± 4	0	0	0	0
OJOS	0	0	0	2 ± 0.7	4.25 ± 1	3 ± 1.5	5.6 ± 1	3.2 ± 1.8	1.8 ± 1.3
CEREBRO	0	0	0	37.2 ± 17.1	46.4 ± 3.6	55.6 ± 8.5	53.6 ± 12.3	114 ± 7.9	43.4 ± 3
TESTÍCULO	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BAZO	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ESÓFAGO	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ESTÓMAGO	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	556	232	512	470	685	668	697	740	614

Cuadro 6.- Número de larvas recuperadas en tejidos de jerbos sacrificados a diferentes periodos después de la inoculación intragástrica con 1000 huevos larvados de *Toxocara canis*. Cada dato representa la media y desviación standard de 5 animales.

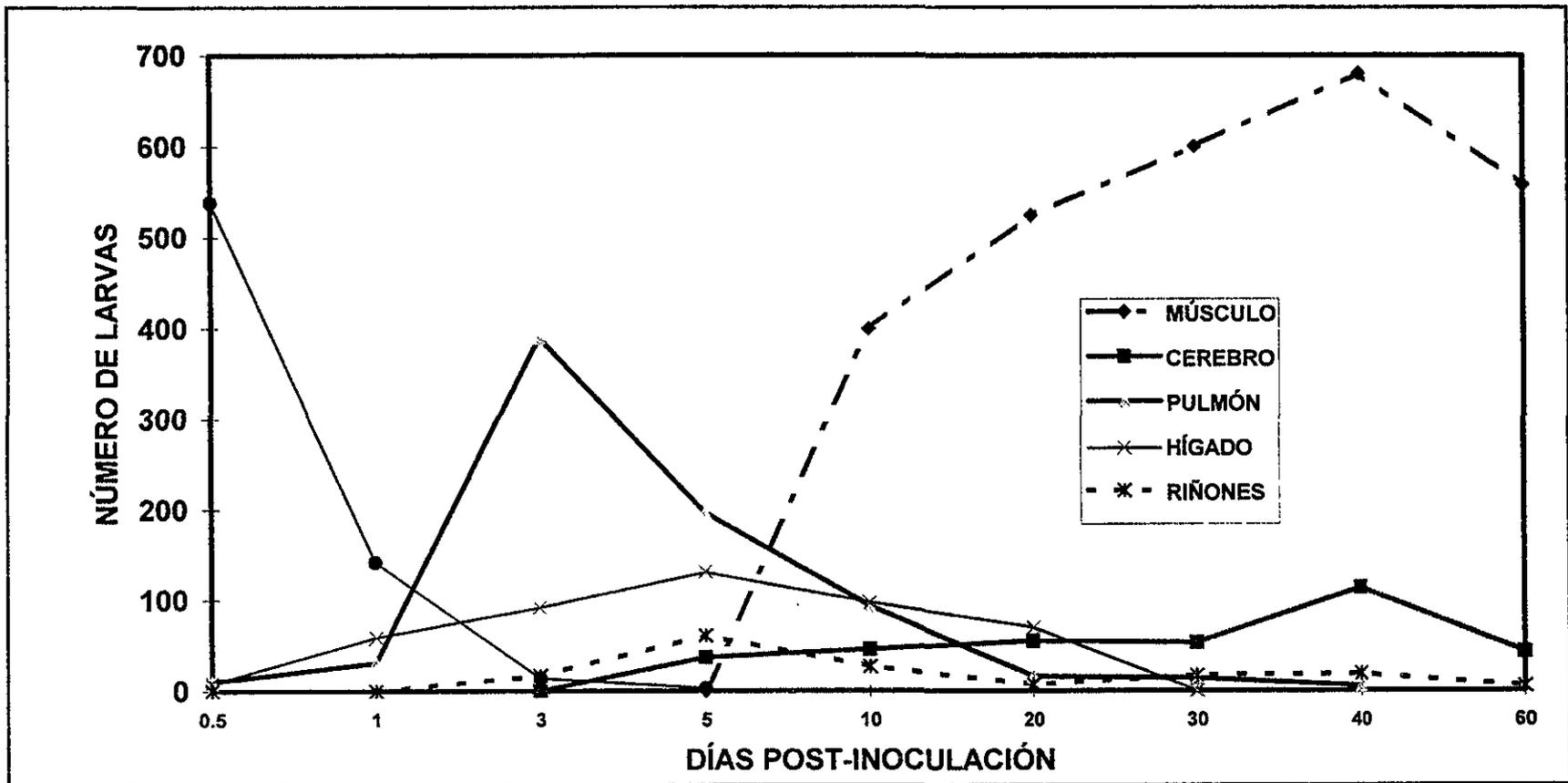


Figura 3.- Número de larvas recuperadas en diferentes tejidos de jerbos sacrificados a diferentes periodos después de la inoculación intragástrica con 1000 huevos larvados de *Toxocara canis*. Cada punto representa la media y desviación standard de 5 animales.

DÍAS P.I.	0.5	1	3	5	10	20	30	40	60
MÚSCULO	0	0	0	1.65	11.66	16.31	18.67	19.98	16.4
CORAZÓN	0	0	0	85.22	48.48	9.52	27.52	23.25	3.78
PULMONES	11.7	37.05	458.82	232.23	103.29	17.33	9.92	5.34	2.8
HÍGADO	2	47.15	46.13	65.82	35.83	29.46	1.04	4.45	1.56
RIÑONES	0	0	26.98	97.87	39.65	11.49	23.52	29.69	10.23
INTESTINO	107.6	28.5	3.5	1.4	0	0	0	0	0
PIEL	0	0	0	0.64	0	0	0	0	0
OJOS	0	0	0	3.92	6	10.58	10.56	6.03	3.39
CEREBRO	0	0	0	36.4	48.63	52.35	62.6	159.5	50.11
TESTÍCULO	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BAZO	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ESÓFAGO	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ESTÓMAGO	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Cuadro 7.- Número de larvas recuperadas por gramo de tejido a diferentes periodos después de la inoculación intragástrica con 1000 huevos larvados de *Toxocara canis*. Cada dato representa la media y desviación standard de 5 jerbos.**

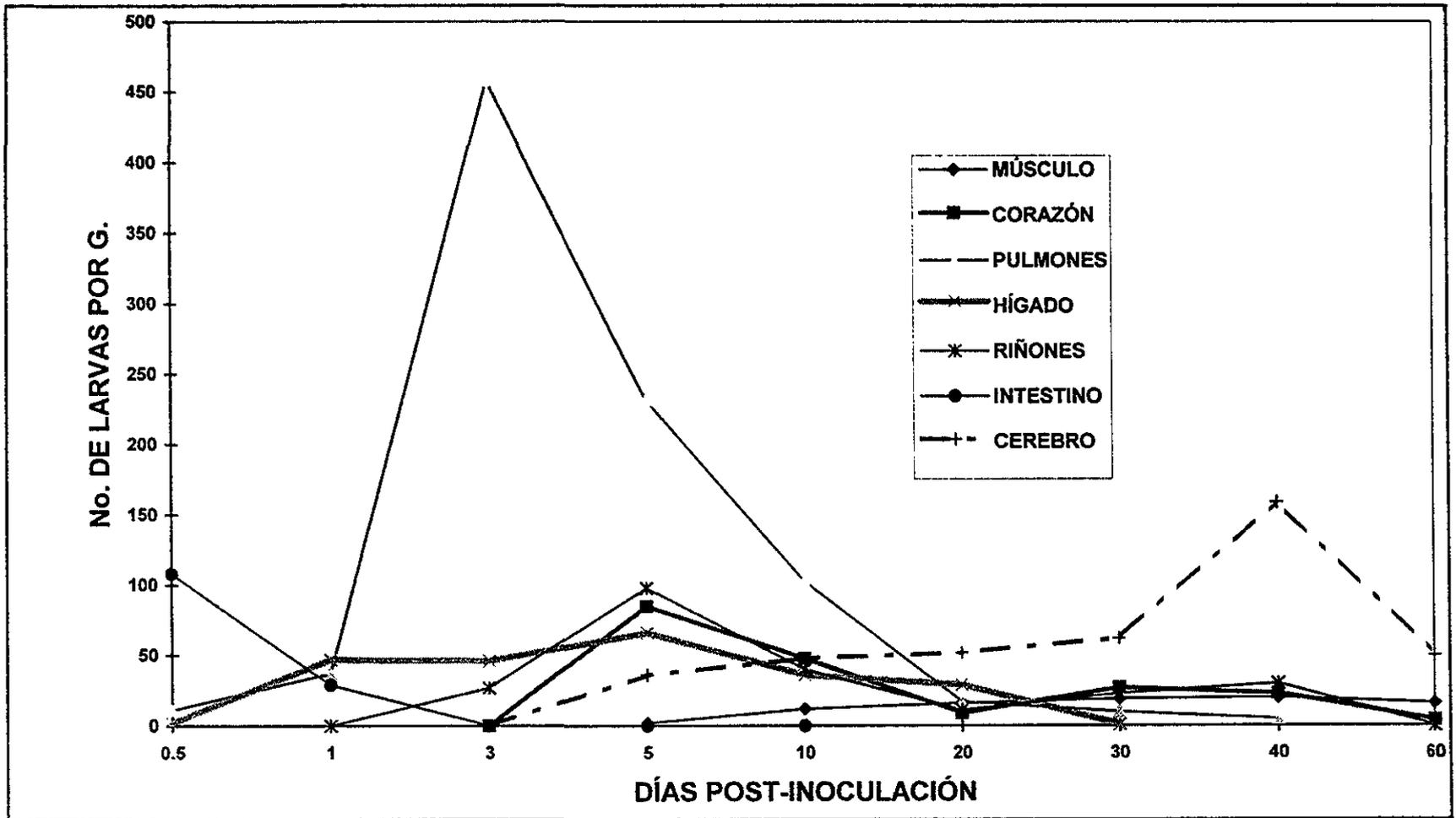


Figura 4.- Número de larvas recuperadas por gramo de tejido a diferentes periodos después de la inoculación intragástrica con 1000 huevos larvados de *Toxocara canis*. Cada punto representa la media de 5 animales.

DIAS P.I.	1	3	5	10	20	30	40	60
MÚSCULO	0	30	190	1380	2086 ±	2050	2100	2133 ±
CORAZÓN	0	17 ± 10.9	84.6 ± 10.6	30.4 ± 5.2	16.8 ± 4.8	14.8 ± 2.7	33 ± 8	13.6 ± 2.8
PULMÓN	116 ± 34.9	654 ± 79.3	493.6 ±	326 ± 59.5	117.7 ±	18.5 ± 3.2	39.2 ± 6.4	39.6 ± 7.1
HÍGADO	290 ± 62.2	752 ±	439.2 ± 86	286 ± 36.3	81.4 ± 33	186 ± 11.2	147 ± 17.2	8 ± 5.8
RIÑONES	0	120 ± 14.1	256.6 ± 44	77.6 ± 13	46.2 ± 11	109.6 ± 12.2	42.5 ± 15.9	51.3 ± 2.4
INTESTINO	1852 ± 56	32.6 ± 11	5.4 ± 3.6	3.6 ± 5.1	0	0	0	0
PIEL	0	3.5 ± 4.6	16 ± 13	11.5 ± 9.3	0	0	0	0
OJOS	0	0	4.2 ± 2.9	15.8 ± 2.9	12.8 ± 9.3	18.2 ± 3.3	18.8 ± 5.1	23.7 ± 1.2
CEREBRO	0	10.8 ± 7.1	223.2 ± 33	259.2 ± 11	409 ± 61.4	508 ± 57	358 ± 45.7	252 ± 27.4
TESTÍCULO	0	0	0	0	0	13.2 ± 1.4	19 ± 3.6	15 ± 5
BAZO	0	0	0	0	0	0	0	0
ESTÓMAGO	6.4 ± 82	0	0	0	0	0	0	0
ESÓFAGO	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	2322	1619.9	1713	2390.1	2769.9	2918.3	2757.5	2536.2

**Cuadro 8.- Número de larvas recuperadas en tejidos de jerbos sacrificados a diferentes periodos después de la inoculación intragástrica con 5000 huevos larvados de *Toxocara canis*. Cada dato representa la media y desviación standard de 5 animales.**

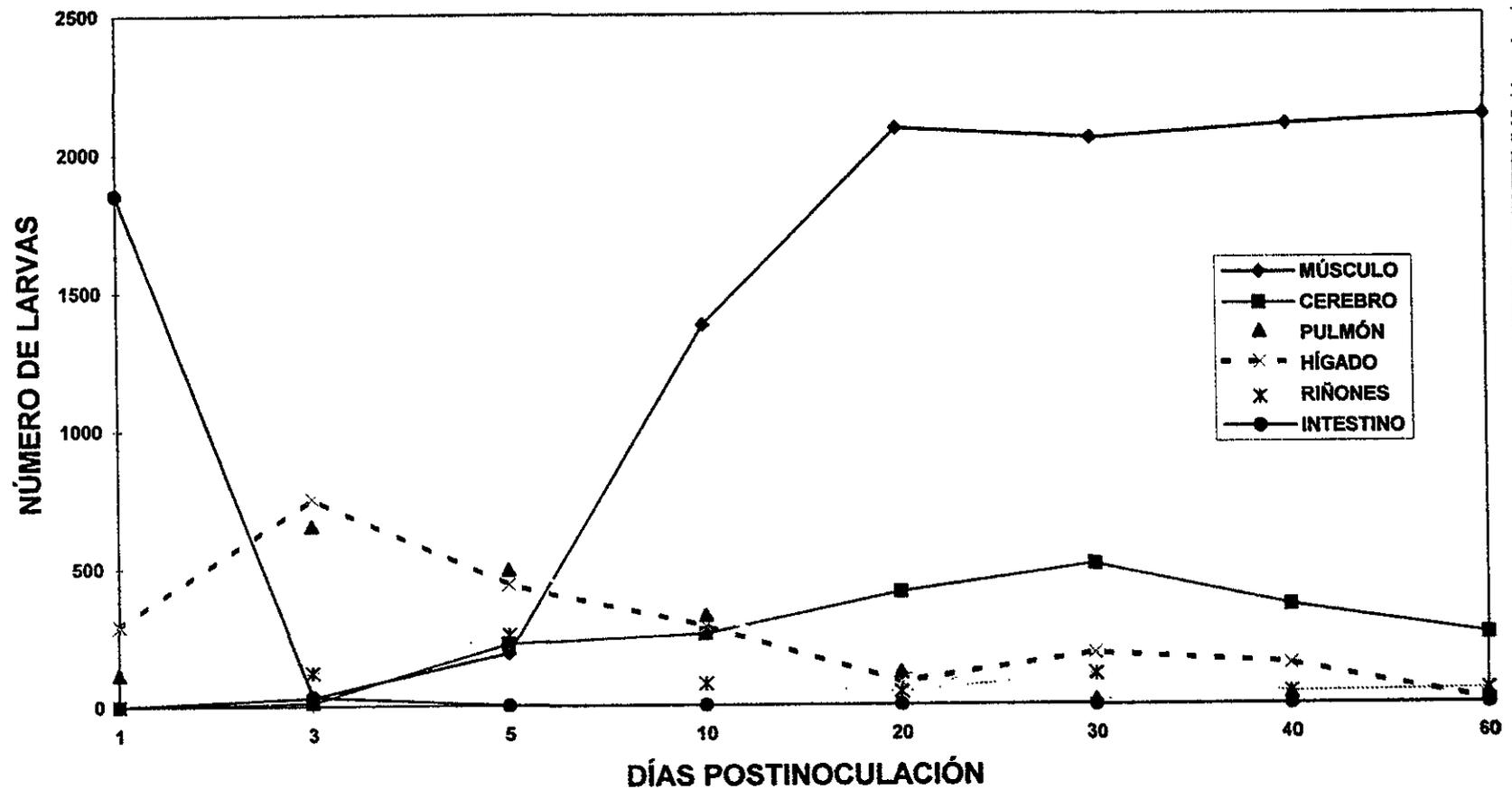


Figura 5.- Número de larvas recuperadas en diferentes tejidos de jerbos sacrificados a diferentes periodos después de la inoculación intragástrica con 5000 huevos larvados de *Toxocara canis*. Cada punto representa la media y desviación standard de 5 animales.

DÍAS P.I.	1	3	5	10	20	30	40	60
CORAZÓN	0	56.6	282	92.12	58	50	98.8	51.74
HÍGADO	145.72	377.8	220.7	104.77	40.72	77.95	63.96	4.16
PULMONES	195.29	769.41	580.94	357.45	102.22	13.9	41.93	57.31
RIÑONES	0	190.4	407.3	113.11	25.2	153.5	64.39	101.4
INTESTINO	370.4	5	0.49	0	0	0	0	0
CEREBRO	0	10.55	218.18	271.69	385.12	500	396	290.99
MÚSCULO	0	0.92	5.83	40.25	64.94	52.84	61.98	60.66
PIEL	0	0	1.6	1.15	0	0	0	0
OJOS	0	0	8	31.6	25.09	34.33	36.15	44.71
BAZO	0	0	0	0	0	0	0	0
TESTÍCULO	0	0	0	0	0	12.6	20.8	14.8
ESÓFAGO	0	0	0	0	0	0	0	0
ESTÓMAGO	0	0	0	0	0	0	0	0

**Cuadro 9.- Número de larvas recuperadas por gramo de tejido a diferentes periodos después de la inoculación intragástrica con 5000 huevos larvados de *Toxocara canis*. Cada dato representa la media y desviación standard de 5 jerbos.**

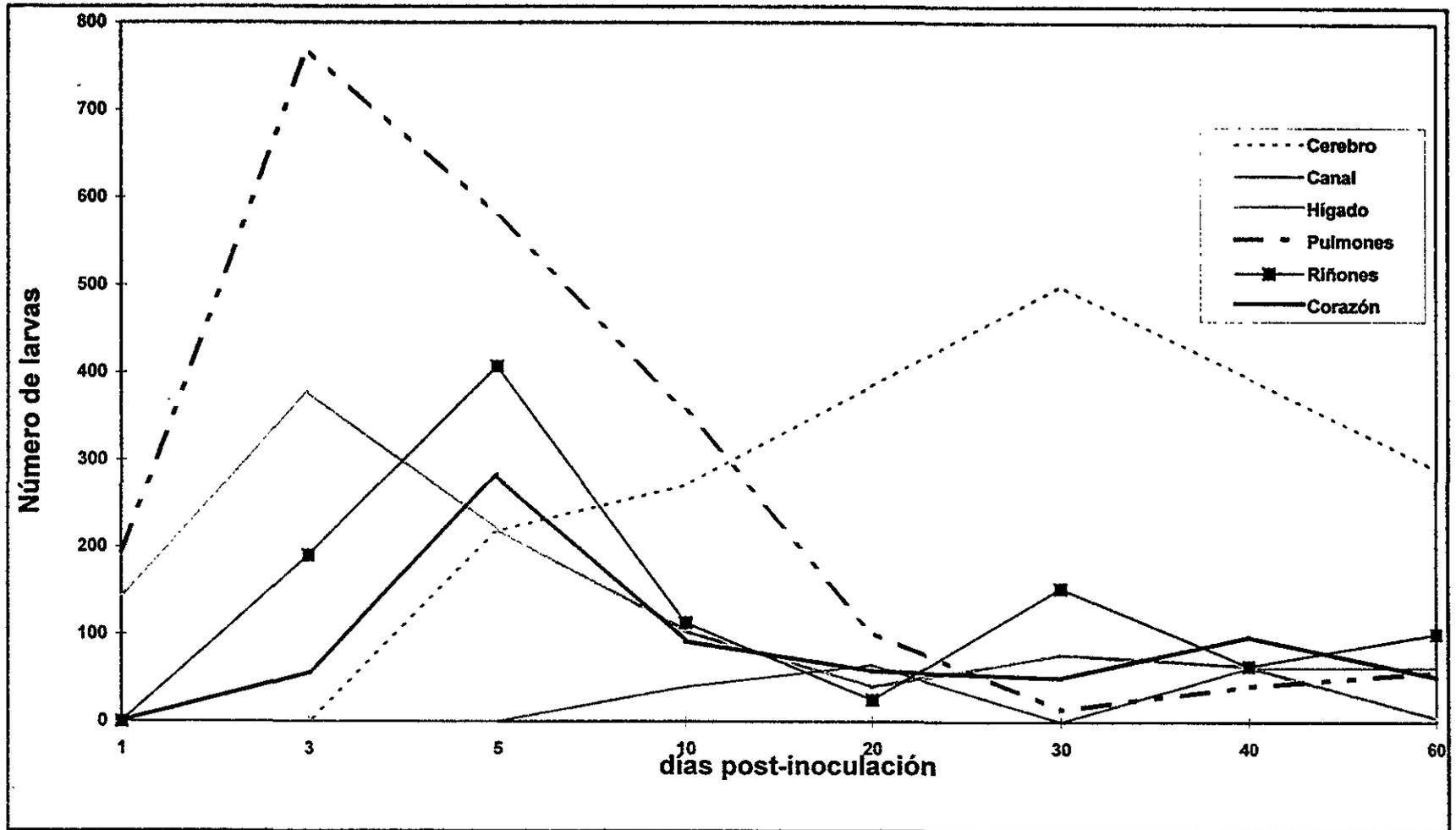


Figura 6.- Número de larvas recuperadas por gramo de tejido a diferentes periodos después de la inoculación intragástrica con 5000 huevos larvados de *Toxocara canis*. Cada punto representa la media de 5 animales.

DÍAS P.I.	5	20	60
1.- MÚSCULO	203	1920	2210
2.- CORAZÓN	81	18	15,4
3.- PULMÓN	427,2	121,2	43,4
4.- HÍGADO	406,6	82,8	9
5.- RIÑONES	219,2	37	62,6
6.- INTESTINO	1	0	0
7.- PIEL	10,2	0	0
8.- OJOS	5	8	15,2
9.- CEREBRO	238,4	410,8	264,8
10.- TESTÍCULO	0	0	2,8
11.- BAZO	0	0	0
12.- ESTÓMAGO	0	0	0
13.- ESÓFAGO	0	0	0

**Cuadro 10.-** Número de larvas recuperadas en diferentes tejidos de jerbos inoculados a diferentes períodos con 5000 huevos larvados de *Toxocara canis*.

<b>DÍAS P.I.</b>	<b>5</b>	<b>20</b>	<b>60</b>
<b>1.- MÚSCULO</b>	<b>4</b>	<b>480</b>	<b>580</b>
<b>2.- CORAZÓN</b>	<b>24,6</b>	<b>9,6</b>	<b>0,2</b>
<b>3.- PULMÓN</b>	<b>187,4</b>	<b>16</b>	<b>4,4</b>
<b>4.- HÍGADOS</b>	<b>128,2</b>	<b>70,4</b>	<b>3,4</b>
<b>5.- RIÑONES</b>	<b>59</b>	<b>6</b>	<b>0</b>
<b>6.- INTESTINO</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>7.- PIEL</b>	<b>4,8</b>	<b>0,6</b>	<b>2</b>
<b>8.- OJOS</b>	<b>2</b>	<b>3,2</b>	<b>41,8</b>
<b>9.- CEREBRO</b>	<b>37,4</b>	<b>43,8</b>	<b>0</b>
<b>10.- TESTÍCULO</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>11.- BAZO</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>12.- ESÓFAGO</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>13.- ESTÓMAGO</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>6,2</b>

**Cuadro 11.- Número de larvas recuperadas en diferentes tejidos de jerbos inoculados a diferentes períodos con 1000 huevos larvados de *Toxocara canis*.**

## **Determinación de la cantidad de linfocitos, eosinófilos, neutrófilos y monocitos en jerbos inoculados con diferentes cantidades de huevos larvados de *Toxocara canis*.**

Con la finalidad de determinar el efecto de la infección de los jerbos con hITc sobre la producción de células sanguíneas, se sangraron los jerbos a los mismos tiempos en que se recuperaron larvas. En las muestras de sangre obtenidas se determinaron las cantidades de: leucocitos totales, linfocitos, eosinófilos, neutrófilos, monocitos, hemoglobina y plaquetas.

El número total de leucocitos por  $\text{mm}^3$  de sangre de jerbos de los diferentes grupos se presenta en el cuadro 12 y figura 7. En estas se observa, que el número de leucocitos en los jerbos inoculados es mayor ( $p < 0.05$ ) que en los jerbos del grupo testigo los días 5, 10 y 20 p.i., no se observan diferencias ( $p < 0.05$ ) los días 1, 30, 40 y 60 p.i. entre los grupos inoculado con hITc y el grupo de jerbos no inoculados. No se observaron diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) en la cantidad de leucocitos sanguíneos entre los tres grupos de jerbos inoculados.

El número total de linfocitos por  $\text{mm}^3$  de sangre en los jerbos inoculados con diferentes cantidades de hITc (200, 1000 y 5000) y sacrificados a diferentes períodos se presenta en el cuadro 13 y la figura 8. En éstas se observa que los jerbos inoculados con 200 hITc presentaron los días 10 y 20 una mayor cantidad de linfocitos que los jerbos del grupo testigo. El comportamiento de los jerbos de los grupos inoculados con 1000 y 5000 hITc es similar, el día 5 presentaron mayor cantidad de linfocitos que el grupo testigo, el día 10 disminuyó la cantidad de linfocitos sanguíneos, incluso la cantidad en el grupo de 5000 hITc fue menor que el grupo testigo ( $p < 0.05$ ). El día 20 la cantidad de linfocitos en sangre es mayor ( $p < 0.05$ ) en los grupos inoculados con 1000 y 5000 hITc que en los testigos, del día 30 al 60 no se presentaron diferencias entre los grupos de jerbos inoculados y el grupo

de jerbos testigo ( $p<0.05$ ).

La comparación del número de eosinófilos en sangre entre los grupos de jerbos inoculados con diferentes cantidades de hITc y un grupo de jerbos no inoculados se presenta en el cuadro 14 y figura 9. Durante todo el experimento, con la excepción del día 60, la cantidad de eosinófilos presentes en la sangre de los jerbos del grupo inoculado con 200 hITc esta dentro de el intervalos de confianza de los jerbos normales, por lo que se considero que no existen diferencias entre este grupo y el grupo testigo ( $p<0.05$ ). Los grupos inoculados con 1000 y 5000 hITc presentaron los días 5 y 40 mayor cantidad de eosinófilos que el grupo testigo ( $p<0.05$ ), no se presentaron diferencias entre los dos grupos en ninguno de los días muestreados ( $p<0.05$ ).

En la figura 10 y cuadro 15 se compara el número de neutrófilos por  $\text{mm}^3$  de sangre de 3 grupos de jerbos inoculados con diferentes cantidades de hITc (200, 1000 y 5000) y sacrificados a diferentes periodos (1, 5, 10, 20, 30, 40 y 60 p.i.) con un grupo de jerbos no inoculados y que se incluyó como grupo testigo. El grupo inoculado con 200 hITc presentó mayor cantidad de neutrófilos sanguíneos que el grupo testigo los días 10 y 20 p.i. ( $p<0.05$ ). El grupo inoculado con 1000 hITc presentó mayor cantidad de neutrófilos sanguíneos que el grupo testigo los días 5, 10 y 20 p.i. ( $p<0.05$ ). Por último el grupo inoculado con 5000 hITc presentó el día 10 p.i. mayor cantidad de neutrófilos en sangre que el grupo testigo ( $p<0.05$ ). El resto de los días no se encontraron diferencias entre los jerbos del grupo testigo y los jerbos de los grupos inoculados ( $p<0.05$ ).

En la figura 11 y cuadro 16 se compara el número de monocitos por  $\text{mm}^3$  de sangre de 3 grupos de jerbos inoculados con diferentes cantidades de hITc (200, 1000 y 5000) y sacrificados a diferentes periodos de tiempo (1, 5, 10, 20, 30, 40 y 60 p.i.) con un grupo de jerbos no inoculados y que se usó como grupo testigo. El grupo inoculado con 200 hITc presentó mayor cantidad de monocitos en sangre que el grupo testigo del día 5 al 40 p.i., no se presentaron diferencias los días 1 y 60 p.i. ( $p<0.05$ ). El grupo inoculado con 1000 hITc presento mayor cantidad de monocitos que el grupo testigo los días 5, 10, 20, 30 y 60 p.i.

( $p < 0.05$ ), no se presentaron diferencias los días 1 y 40 p.i.. Los jerbos del grupo inoculado con 5000 hITc presentaron mayor cantidad de monocitos sanguíneos los días 5, 20 y 30 p.i. ( $p < 0.05$ ), no se presentaron diferencias los días 1, 10, 40 y 60 p.i. ( $p < 0.05$ ).

### **Determinación de la cantidad de hemoglobina y plaquetas en jerbos inoculados con diferentes cantidades de hITc.**

En muestras de sangre colectada a diferentes periodos después de la inoculación de jerbos con diferentes cantidades de hITc se determinó la cantidad de hemoglobina y plaquetas.

En el cuadro 17 y figura 12 se compara la cantidad de gramos de hemoglobina por decilitro de sangre entre grupos jerbos inoculados con diferentes cantidades de hITc (200, 1000 y 5000) sacrificados a diferentes períodos y un grupo de jerbos no inoculados. No se presentaron diferencias entre los grupos de jerbos infectado y el grupo testigo, tampoco se presentaron diferencias en los grupos inoculados o en los diferentes días de muestreo ( $p < 0.05$ ).

En el cuadro 18 se compara la cantidad de plaquetas por decilitro de sangre entre grupos de jerbos inoculados con diferentes cantidades de hITc (200, 1000 y 5000) sacrificados a diferentes períodos y un grupo de jerbos no inoculados. No se presentaron diferencias entre los diferentes grupos muestreados o en los diferentes días ( $p < 0.05$ ).

<b>NÚMERO DE HUEVOS</b>	<b>1DÍA P.I.</b>	<b>5 DÍAS P.I.</b>	<b>10 DÍAS P.I.</b>	<b>20 DÍAS P.I.</b>	<b>30 DÍAS P.I.</b>	<b>40 DÍAS P.I.</b>	<b>60 DÍAS P.I.</b>
<b>200</b>	<b>6327 ± 984</b>	<b>7566 ± 1020</b>	<b>10300 ± 9800</b>	<b>11700 ± 1134</b>	<b>7100 ± 2610</b>	<b>7210 ± 1330</b>	<b>6660 ± 1943</b>
<b>1000</b>	<b>7087 ± 954</b>	<b>10550 ± 1815</b>	<b>11154 ± 9.2</b>	<b>10920 ± 917</b>	<b>8810 ± 652</b>	<b>8426 ± 4320</b>	<b>7718 ± 787</b>
<b>5000</b>	<b>6499 ± 1063</b>	<b>10100 ± 1184</b>	<b>7680 ± 1272</b>	<b>11961 ± 1235</b>	<b>5920 ± 1716</b>	<b>7780 ± 2677</b>	<b>5525 ± 471</b>
<b>testigo</b>	<b>6791 ± 1083</b>	<b>6791 ± 1083</b>	<b>6791 ± 1083</b>	<b>6791 ± 1083</b>	<b>6791 ± 1083</b>	<b>6791 ± 1083</b>	<b>6791 ± 1083</b>

**Cuadro 12.- Número total de leucocitos por mm<sup>3</sup> encontrados en sangre de jerbos obtenida a diferentes períodos después de ser inoculados con diferentes cantidades de huevos larvados de *Toxocara canis*.**

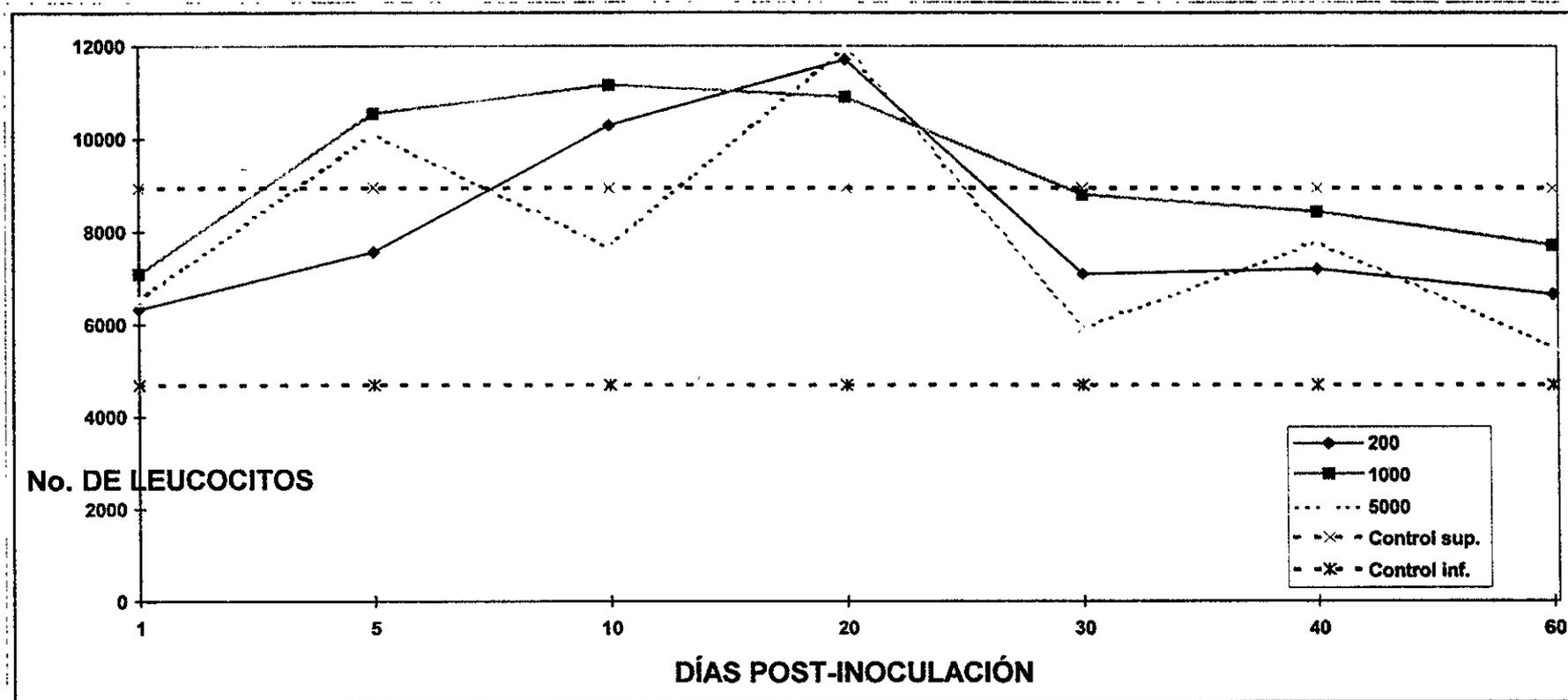


Figura 7.- Número total de leucocitos por  $\text{mm}^3$  de sangre de jerbos sacrificados a diferentes periodos de tiempo después de ser inoculados con diferentes cantidades de huevos larvados de *Toxocara canis*. Cada punto de los grupos inoculados representa la media de 5 jerbos. El grupo testigo representa la media más menos dos veces la desviación standard (intervalo de confianza) de 12 jerbos normales, los puntos de los grupos inoculados por fuera de las líneas del grupo testigo son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ) que los normales.

NÚMERO DE HUEVOS	1	5	10	20	30	40	60
200	4798 ± 491	5598 ± 447	6893 ± 603	7113 ± 859	5342 ± 826	5296 ± 687	4755 ± 739
1000	5987 ± 658	6303 ± 1309	4573 ± 839	7502 ± 764	6255 ± 897	5325 ± 1095	6251 ± 432
5000	4989 ± 956	7070 ± 585	4131 ± 855	8576 ± 997	4907 ± 1113	5601 ± 1082	4019 ± 184
testigo	5313 ± 462	5313 ± 462	5313 ± 462	5313 ± 462	5313 ± 462	5313 ± 462	5313 ± 462

**Cuadro 13.- Número total de linfocitos por mm<sup>3</sup> encontrados en sangre de jerbos obtenida a diferentes períodos después de ser inoculados con diferentes cantidades de huevos larvados de *Toxocara canis*.**

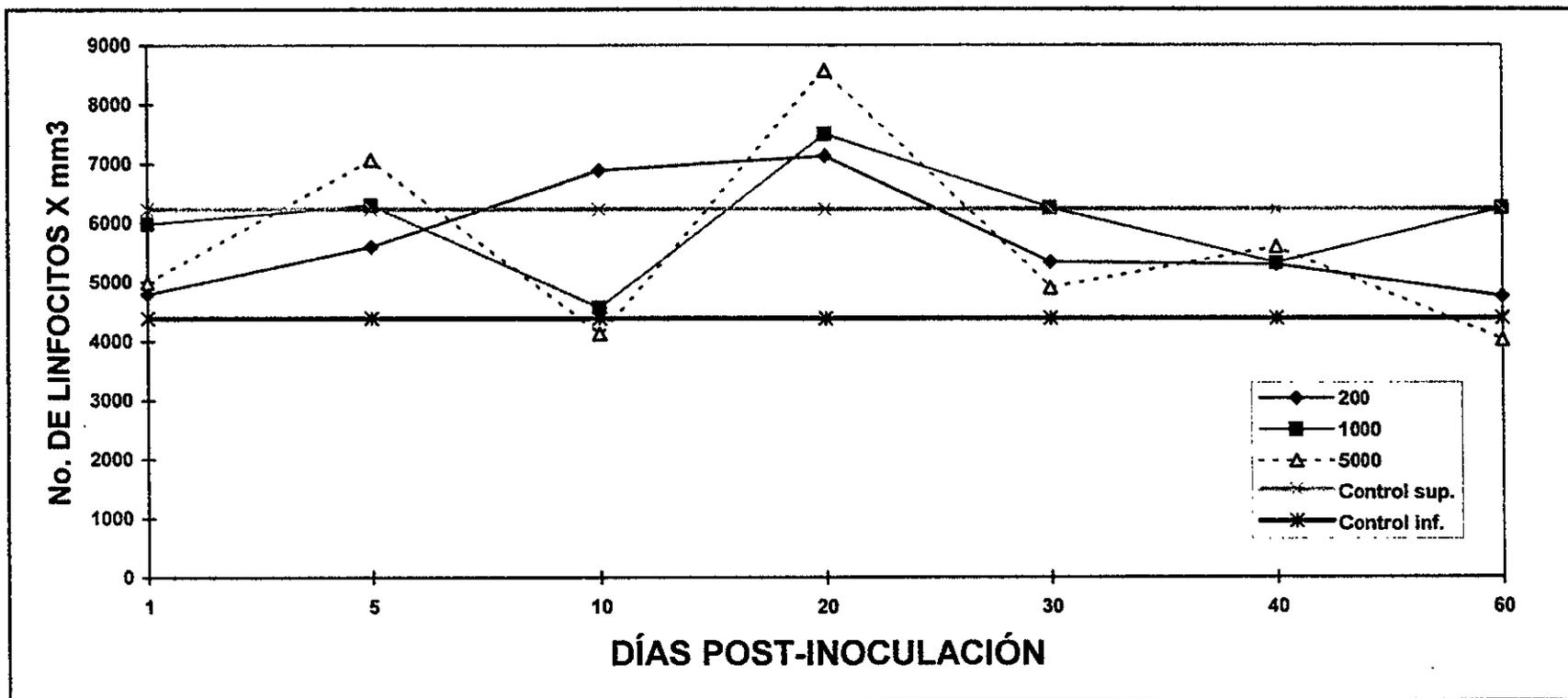
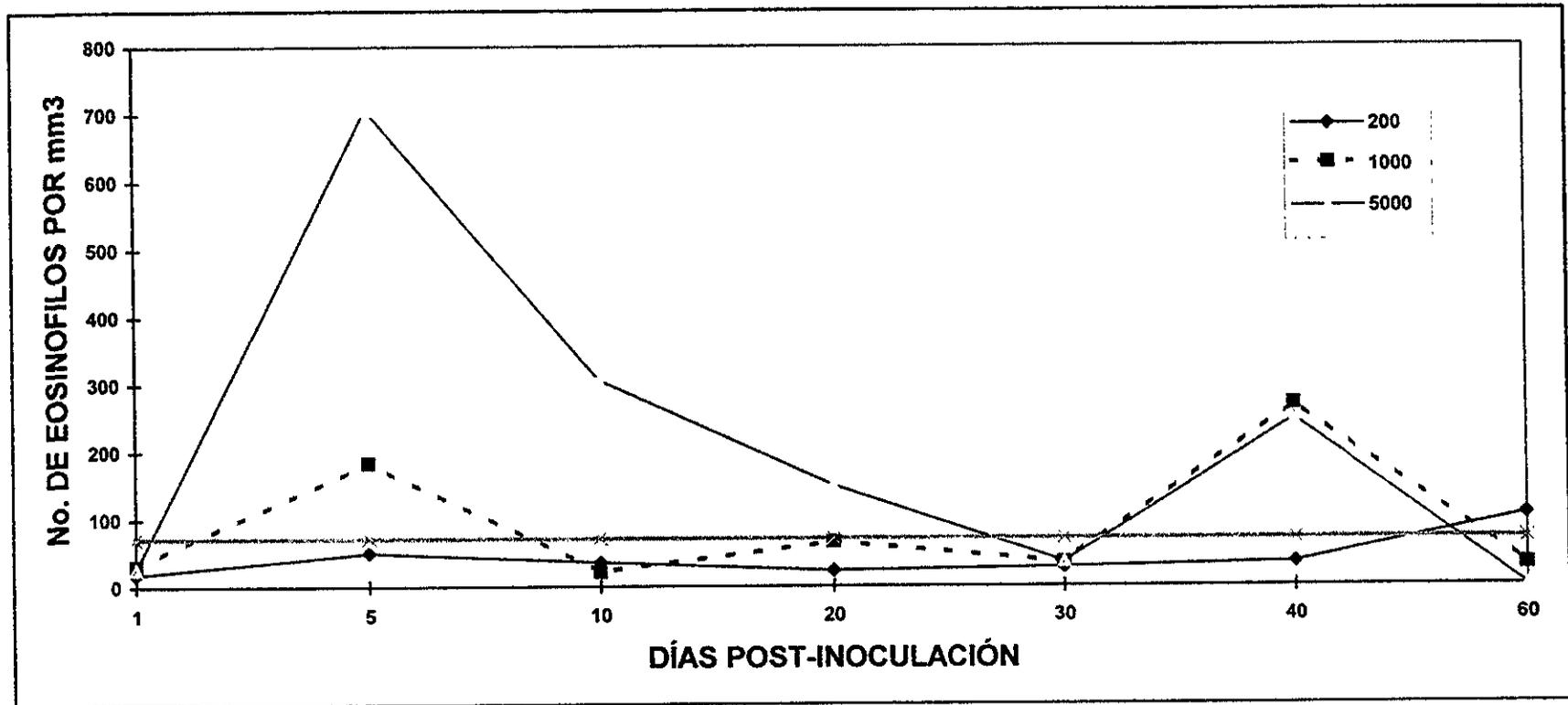


Figura 8.- Número total de linfocitos por  $\text{mm}^3$  de sangre de jerbos sacrificados a diferentes períodos después de ser inoculados con diferentes cantidades de huevos larvados de *Toxocara canis*. Cada punto de los grupos inoculados representa la media de 5 jerbos. El grupo testigo representa la media más menos dos veces la desviación standard (intervalo de confianza) de 12 jerbos normales, los puntos de los grupos inoculados por fuera de las líneas del grupo testigo son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ) que los normales.

NÚMERO DE HUEVOS	1 DÍA P.I.	5 DÍAS P.I.	10 DÍAS P.I.	20 DÍAS P.I.	30 DÍAS P.I.	40 DÍAS P.I.	60 DÍAS P.I.
200	18 ± 18.4	49.9 ± 35	36 ± 15	23.4 ± 46	28 ± 18	35 ± 35	106.5 ± 31.9
1000	31 ± 12	184.6 ± 86	22.3 ± 44	65.5 ± 52.4	35.2 ± 35	269.6 ± 208	30.8 ± 37
5000	27 ± 12.4	707 ± 355	307 ± 61.4	149.5 ± 98	35.5 ± 47.36	248.9 ± 227	13.8 ± 23
testigo	20.8 ± 25	20.8 ± 25	20.8 ± 25	20.8 ± 25	20.8 ± 25	20.8 ± 25	20.8 ± 25

**Cuadro 14.- Número total de Eosinófilos por mm<sup>3</sup> encontrados en sangre de jerbos obtenida a diferentes períodos después de ser inoculados con diferentes cantidades de huevos larvados de *Toxocara canis*.**



**Figura 9.-** Número total de eosinófilos por  $\text{mm}^3$  de sangre de jerbos sacrificados a diferentes períodos después de la inoculación con diferentes cantidades de huevos larvados de *Toxocara canis*. Cada punto de los grupos inoculados representa la media de 5 jerbos. El grupo testigo representa la media más dos veces la desviación standard (intervalo de confianza) de 12 jerbos normales, los puntos de los grupos inoculados por arriba de la línea del grupo testigo son estadísticamente mayores ( $p < 0.05$ ) que los normales.

<b>NÚMERO DE HUEVOS</b>	<b>1 DÍA P.I.</b>	<b>5 DÍAS P.I.</b>	<b>10 DÍAS P.I.</b>	<b>20 DÍAS P.I.</b>	<b>30 DÍAS P.I.</b>	<b>40 DÍAS P.I.</b>	<b>60 DÍAS P.I.</b>
<b>200</b>	<b>1682 ± 732</b>	<b>1689 ± 453</b>	<b>2906 ± 532</b>	<b>4352 ± 936</b>	<b>1508 ± 739</b>	<b>1597 ± 409</b>	<b>1678 ± 995</b>
<b>1000</b>	<b>1821 ± 328</b>	<b>3877 ± 143</b>	<b>5220 ± 952</b>	<b>2708 ± 536</b>	<b>2325 ± 914</b>	<b>2763 ± 880</b>	<b>1234 ± 355</b>
<b>5000</b>	<b>1452 ± 304</b>	<b>2040.2 ± 436</b>	<b>3394 ± 852</b>	<b>2482 ± 516</b>	<b>2403 ± 1199</b>	<b>2069 ± 868</b>	<b>1408 ± 148</b>
<b>testigo</b>	<b>1494 ± 476</b>	<b>1494 ± 476</b>	<b>1494 ± 476</b>	<b>1494 ± 476</b>	<b>1494 ± 476</b>	<b>1476 ± 476</b>	<b>1494 ± 476</b>

**Cuadro 15.- Número total de neutrófilos por mm<sup>3</sup> encontrados en sangre de jerbos obtenida a diferentes períodos después de ser inoculados con diferentes cantidades de huevos larvados de *Toxocara canis*.**

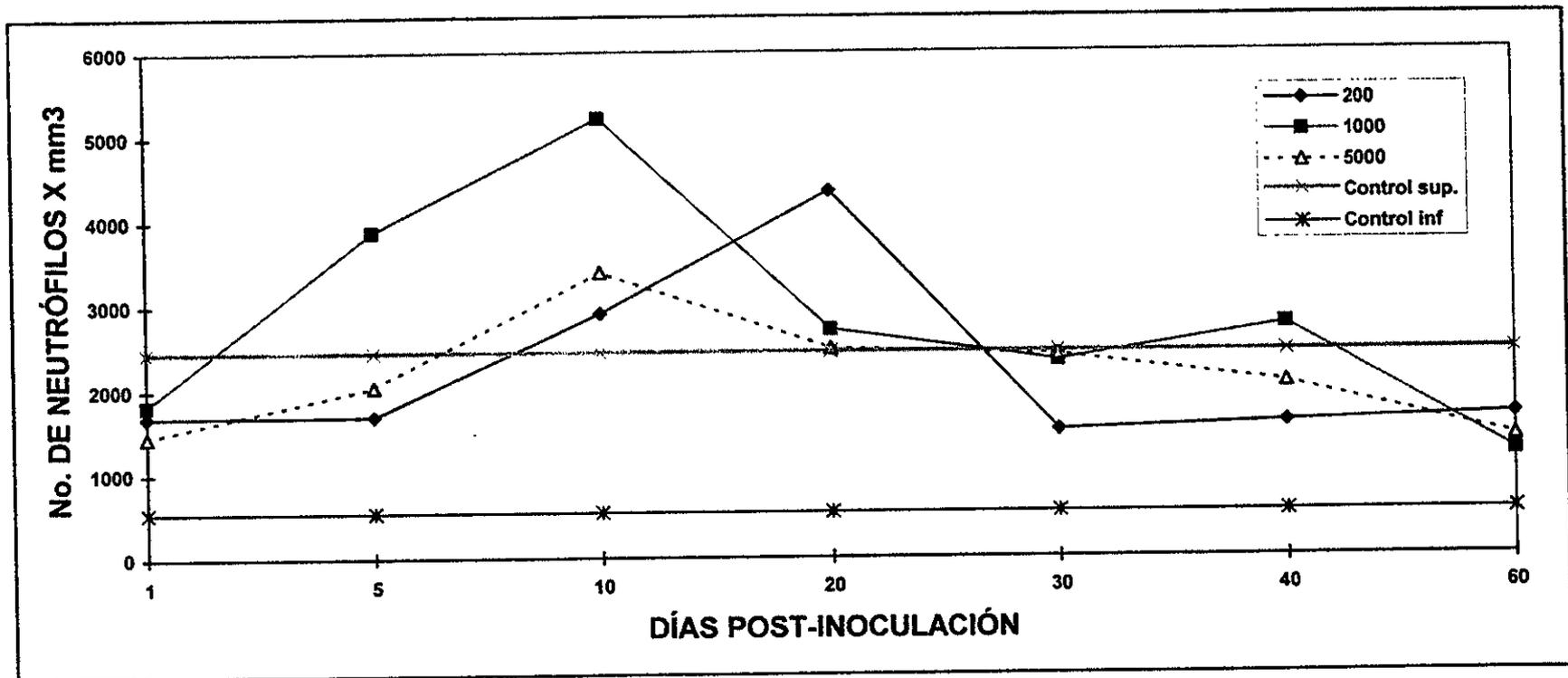
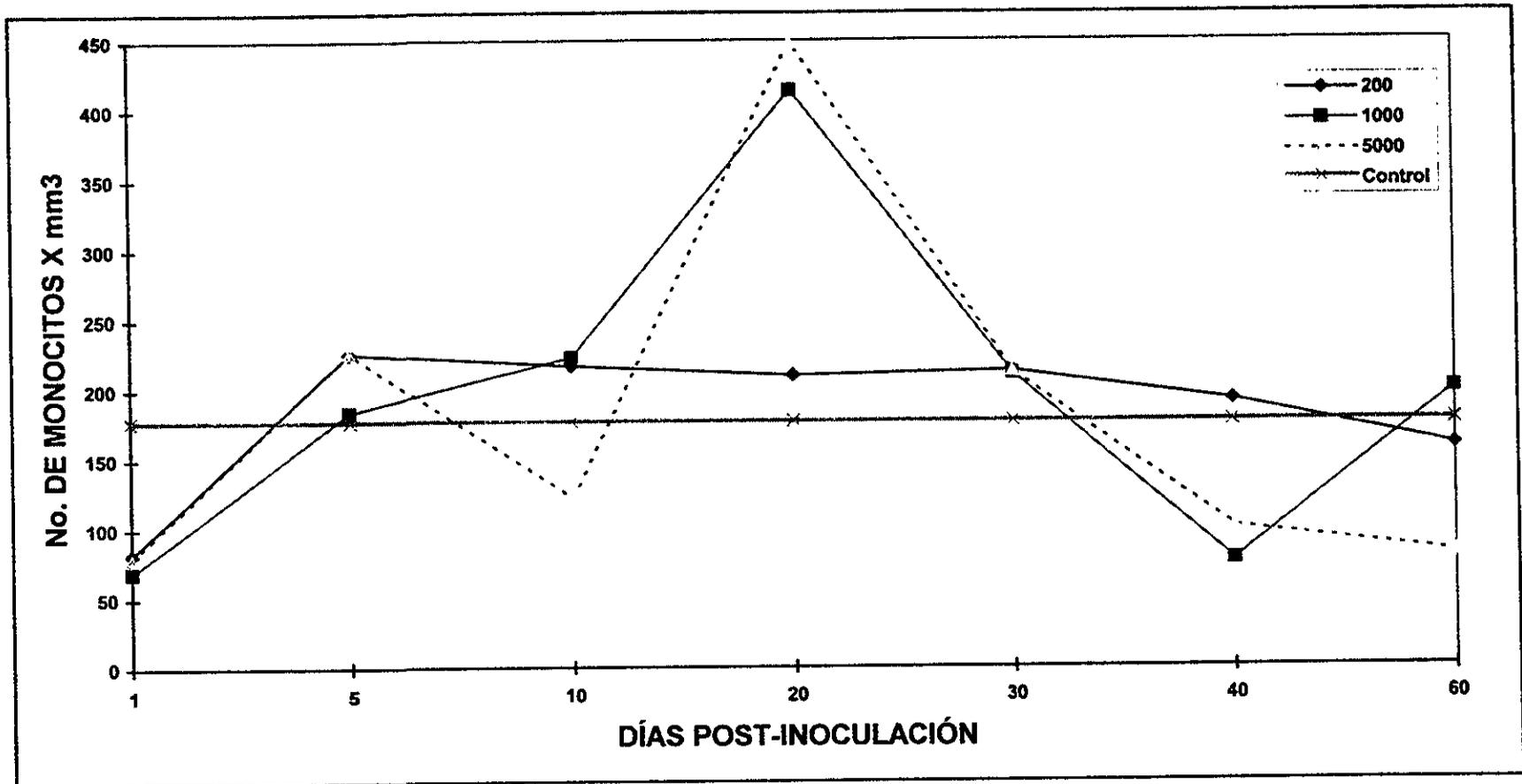


Figura 10.- Número total de neutrófilos por  $\text{mm}^3$  de sangre de jerbos sacrificados a diferentes períodos después de la inoculación con diferentes cantidades de huevos larvados de *Toxocara canis*. Cada punto de los grupos inoculados representa la media de 5 jerbos. El grupo testigo representa la media más menos dos veces la desviación standard (intervalo de confianza) de 12 jerbos normales, los puntos de los grupos inoculados por fuera de las líneas del grupo testigo son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ) que los normales.

No. de huevos	1 Días p.i.	5 Días p.i.	10 Días p.i.	20 Días p.i.	30 Días p.i.	40 Días p.i.	60 Días p.i.
200	82 ± 32	226 ± 62	217 ± 51	210 ± 113	213 ± 32	192 ± 73	159 ± 133
1000	69 ± 46	184 ± 200	223 ± 74	414 ± 124	211 ± 65	77 ± 62	200 ± 92
5000	79 ± 29	227 ± 79	122 ± 62	448 ± 75	213 ± 67	101 ± 75	82 ± 60
Testigo	67 ± 55	67 ± 55	67 ± 55	67 ± 55	67 ± 55	67 ± 55	67 ± 55

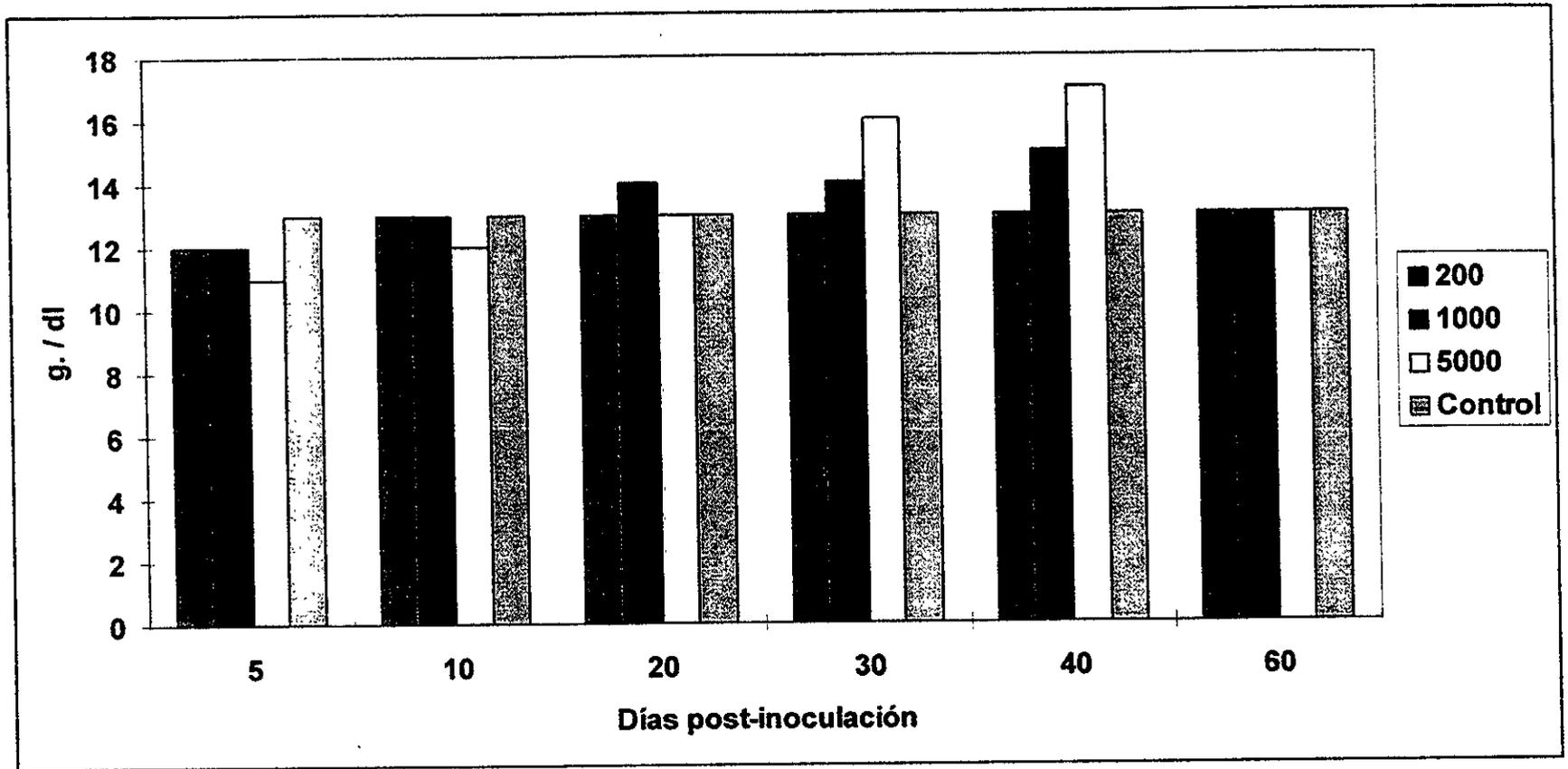
**Cuadro 16.- Número total de monocitos por mm<sup>3</sup> encontrados en sangre de jerbos obtenida a diferentes períodos después de ser inoculados con diferentes cantidades de huevos larvados de *Toxocara canis*.**



**Figura 11.-** Número total de monocitos por mm<sup>3</sup> de sangre de jerbos sacrificados a diferentes períodos después de la inoculación con diferentes cantidades de huevos larvados de *Toxocara canis*. Cada punto de los grupos inoculados representa la media de 5 jerbos. El grupo testigo representa la media más dos veces la desviación standard (intervalo de confianza) de 12 jerbos normales, los puntos de los grupos inoculados por arriba de la línea del grupo testigo son estadísticamente mayores ( $p < 0.05$ ) que los normales.

No. de huevos	5 Días p.i.	10 Días p.i.	20 Días p.i.	30 Días p.i.	40 Días p.i.	60 Días p.i.
200	12.8 ± 0.4	13.1 ± 0.67	13.6 ± 0.65	13.3 ± 0.33	12.9 ± 1.9	13.38 ± 0.23
1000	11.9 ± 1.4	13.6 ± 0.44	13.9 ± 0.4	14 ± 0.53	14.7 ± 0.52	13.3 ± 0.47
5000	10.9 ± 1.3	12 ± 0.95	13.5 ± 0.59	15.6 ± 1	16.9 ± 1.2	13.3 ± 2.6
Testigo	13.5 ± 0.48	13.5 ± 0.48	13.5 ± 0.48	13.5 ± 0.48	13.5 ± 0.48	13.5 ± 0.48

**Cuadro 17.- Gramos de hemoglobina por decilitro de sangre de jerbos inoculados a diferentes períodos con diferentes cantidades de huevos larvados de *Toxocara canis*. Cada dato representa la media y la desviación standard de 5 animales.**



**Figura 12.-** Determinación de la cantidad de hemoglobina por decilitro de sangre de jerbos sacrificados a diferentes períodos después de la inoculación con diferentes cantidades de huevos larvados de *Toxocara canis*. Cada punto representa el promedio de 5 animales.

No. de huevos	5 Días p.i.	10 Días p.i.	20 Días p.i.	30 Días p.i.	40 Días p.i.	60 Días p.i.
200	616.6 ± 41.8	569 ± 64	582 ± 59.7	535 ± 75.6	537 ± 53	530 ± 61.6
1000	645 ± 82.6	548 ± 80	518 ± 48.3	575 ± 83	517 ± 46.5	498 ± 73.3
5000	605 ± 132	552 ± 42.6	385 ± 32	500 ± 105	466 ± 40.7	575 ± 51.7
Testigo	554 ± 96.3	554 ± 96.3	554 ± 96.3	554 ± 96.3	554 ± 96.3	554 ± 96.3

**Cuadro 18.- Número total de plaquetas por mm<sup>3</sup> de sangre de jerbos inoculados a diferentes períodos con diferentes cantidades de huevos larvados de *Toxocara canis*.**

## **Cambios patológicos presentes en tracto digestivo de jerbos inoculados experimentalmente con 1000 hITc.**

El intestino de los jerbos sacrificados los días 1, 3 y 5 p.i. presentaron zonas con congestión y hemorragias en la superficie, estas lesiones no tuvieron una localización determinada en el intestino (Figura 13a). Entre los días 10 y 60 p.i. no se observaron lesiones macroscópicas aparentes en intestino (Cuadro 19).

El día 1 y 3 p.i. se observaron en la serosa abundantes focos de inflamación aguda con infiltrado de neutrófilos y eosinófilos alrededor de las larvas que morfológicamente estaban intactas (figura 13b y 13d). Otra alteración observada en estos días fue edema en submucosa y vasos linfáticos dilatados y con infiltrado celular (figura 13b). Así mismo, focos de este tipo se presentaron en las diferentes regiones del intestino. Entre los días 5 y 10 sólo se observaron restos de estos focos inflamatorios sin ninguna larva dentro, en días posteriores no se observaron larvas o lesiones.

No se observó ninguna lesión en estómago o esófago de los animales inoculados con hITc en ninguno de los muestreos.

## **Cambios patológicos presentes en pulmones de jerbos inoculados experimentalmente con 1000 hITc.**

La secuencia de las lesiones macroscópicas de pulmones se presentan en el cuadro 20. El día 1 p.i. los pulmones presentaron macroscópicamente pequeños focos (puntos) rojos sobre la superficie (figura 14a). El día 3 p.i. los puntos rojos sobre la superficie tendieron a crecer y a confluir (figura 14c). El día 5 p.i. estos se unieron y estructuraron lesiones difusas de color púrpura y con forma y tamaño variable que abarcaban más del 80 % de la superficie de los pulmones (figura 14b). El día 10 p.i. las lesiones superficiales comenzaron a palidecer, circunscribirse y tendieron a separarse (figura 14d). El día 20 p.i. la

mayoría de ellas se observaban blancas y algunos pulmones presentaron además petequias en la superficie. Del día 30 al 60 p.i. los pulmones no evidenciaban lesiones y sólo presentaron algunos puntos blancos o rojos sobre la superficie (Cuadro 20, figuras 14e y 14f).

Los pulmones de los jerbos sacrificados el día 1 p.i. presentaron microscópicamente hemorragias moderadas sin infiltrado leucocitario. El día 3 p.i. se observaron larvas asociadas a fuertes hemorragias, infiltrado de neutrófilos, eosinófilos y algunos monocitos, enfisema, y engrosamiento de septos alveolares (figura 15A).

Los pulmones de los jerbos sacrificados el día 5 p.i. presentaron microscópicamente fuertes hemorragias, infiltrado generalizado de neutrófilos, eosinófilos y macrófagos. Ruptura y engrosamiento de paredes alveolares. Alrededor de algunas larvas se observó infiltrado de neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y algunas células epitelioides.

El día 10 p.i. en pulmones se detectaron sólo algunas larvas rodeadas de linfocitos, fibroblastos, escasos neutrófilos y eosinófilos, los eritrocitos son escasos y hay gran cantidad de macrófagos activados con hemosiderina (figuras 15B y 15C). Se presentó además aumento de tejido linfoide asociado a bronquios. Sobre la superficie se observaron extensas zonas con tejido conectivo y colágena (Figura 15C).

Entre el día 20 y 60 p.i. se observaron en pulmones lesiones granulomatosas crónicas bien formadas con fibrocitos, linfocitos y macrófagos, sólo en algunos de estos el corte demostró una larva dentro. Los pulmones presentaron procesos de cicatrización con hemosiderina dentro de macrófagos (figura 16C y 16D) incremento de tejido de tejido linfoide asociado a bronquios (figura 16A). Así mismo, llamó la atención la presencia en algunos pulmones de zonas con inflamación aguda caracterizada por infiltrado de neutrófilos y eosinófilos (figura 15d).

<b>DÍAS P.I.</b>	<b>S.C.P.A.</b>	<b>PUNTOS HEMORRAGICOS</b>
<b>1</b>	<b>0</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2</b>
<b>5</b>	<b>4</b>	<b>1</b>
<b>10</b>	<b>5</b>	<b>0</b>
<b>20</b>	<b>5</b>	<b>0</b>
<b>30</b>	<b>5</b>	<b>0</b>
<b>40</b>	<b>5</b>	<b>0</b>
<b>60</b>	<b>5</b>	<b>0</b>

**Cuadro 19.- Lesiones macroscópicas en intestino de jerbos inoculados intragástricamente con 1000 huevos larvados de *T. canis*. Cada uno de los días p.i. se sacrificaron 5 animales.**

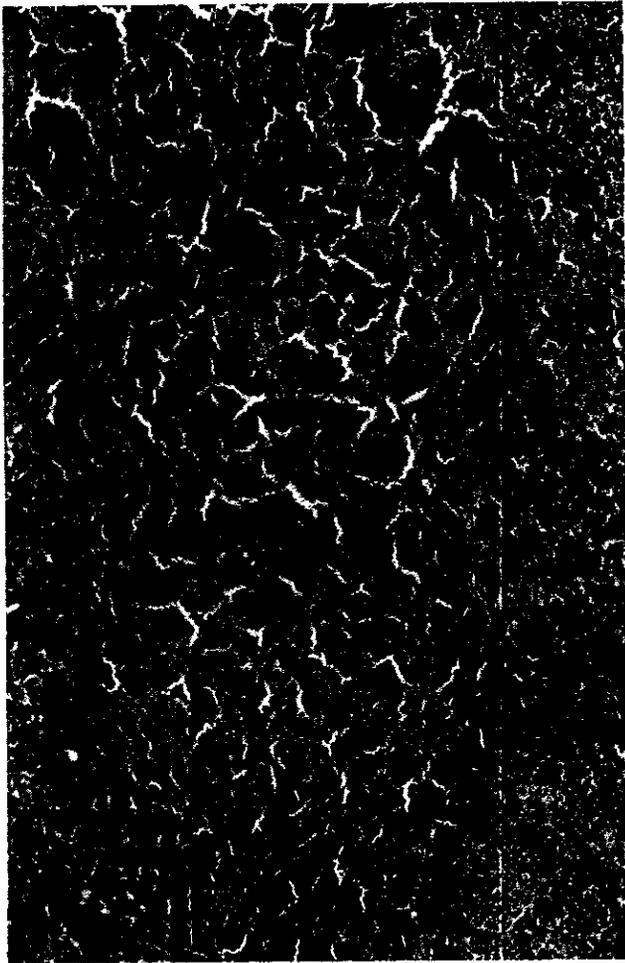
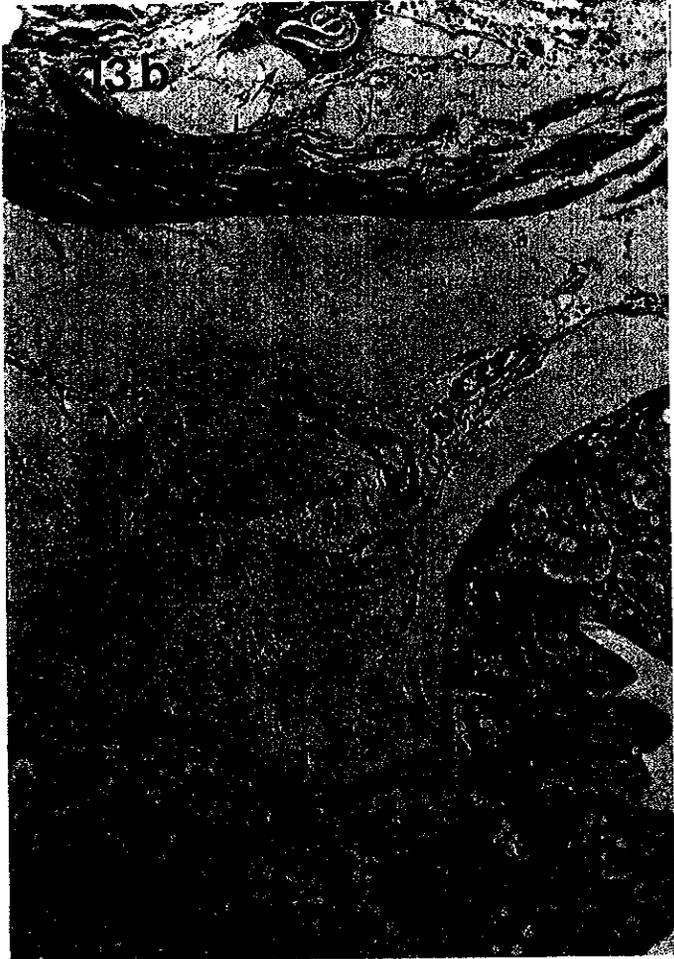
**S.C.P.A.= sin cambios patológicos aparentes**

<b>DÍAS P.I.</b>	<b>HEMORRAGIAS DIFUSAS MULTIFOCALES</b>	<b>PUNTOS ROJOS SUPERFICIALES</b>	<b>PUNTOS BLANCOS SUPERFICIALES</b>	<b>PETEQUIAS</b>
<b>1</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>3</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>5</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>20</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>3</b>
<b>30</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>0</b>
<b>40</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>0</b>
<b>60</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>0</b>

**Cuadro 20.- Lesiones macroscópicas en pulmones de jerbos inoculados intragástricamente con 1000 huevos larvados de *T. canis*. Cada uno de los días p.i. se sacrificaron 5 animales.**

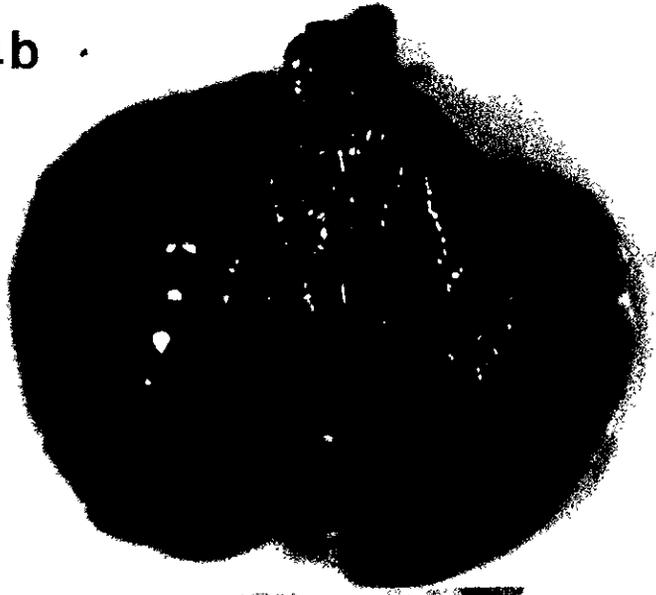
- Fig. 13A.- Intestino de un jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 3 días p.i.. Se observan hiperemia y zonas con hemorragias en la serosa de distintas partes del intestino.
- Fig. 13B.- Corte histológico de intestino de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los tres días p.i., teñido con H-E 10X. En la parte superior de esta microfotografía se observa en la serosa una larva aparentemente intacta con gran infiltrado celular rodeándola. Los vasos linfáticos se presentan dilatados y la submucosa con abundante drenaje celular.
- Fig. 13C.- Corte histológico de bazo de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los tres días p.i., teñido con H-E 10X. No se observan cambios patológicos aparentes, solo un aumento de la actividad celular.
- Fig. 13D.- Corte histológico de intestino de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 3 días p.i., teñido con 10X. En esta microfotografía se observa en serosa una larva aparentemente intacta rodeada por neutrófilos y eosinófilos. Cerca hay un vaso linfático dilatado.
- Fig. 14a.- Pulmón de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a las 24 horas p.i.. Se observan pequeños puntos rojos sobre la superficie, que sugieren petequias.
- Fig. 14b.- Pulmón de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 5 días p.i.. Se presentan grandes zonas hemorrágicas confluentes sobre la superficie.
- Fig. 14c.- Pulmón de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 3 días p.i.. Se observan manchas rojas sobre la superficie que tienden a confluir.
- Fig. 14d.- Pulmón de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 10 días p.i.. Se observa la superficie de color café con manchas más oscuras en algunas zonas.
- Fig. 14e.- Pulmón de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 60 días p.i.. Se observa la superficie de color café pálido con algunas manchas oscuras.
- Fig. 14f.- Pulmón de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 60 días p.i.. Se observa en la superficie algunas zonas de color rosa, otras café pálido y otras café oscuro. La superficie pulmonar se presenta irregular.
- Fig. 15A.- Corte histológico de pulmón de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 3 días p.i., teñido con H-E 10X. Se observa una zona con enfisema, fuerte hemorragia, infiltrado de neutrófilos, eosinófilos y monocitos.

- Fig. 15B.-** Corte histológico de pulmón de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 10 días p.i., teñido con H-E 40X. Se observa una zona con fuerte infiltrado de macrófagos activados, algunos de ellos presentan citoplasma vacuolado y con pigmento pardo sugestivo de hemosiderina.
- Fig. 15C.-** Corte histológico de pulmón de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 10 días p.i., teñido con H-E 10X. Se observa un granuloma en la parte inferior con algunos eosinófilos rodeados de fibrocitos y colágena rodeando al granuloma hay algunos neutrófilos y en la parte superior del mismo hay fuerte infiltrado de macrófagos con hemosiderina. El borde del tejido presenta una zona con tejido conectivo.
- Fig. 15D.-** Corte histológico de pulmón de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 40 días p.i., teñido con H-E 40X. En esta microfotografía se observa en la parte media un granuloma formado por una larva con algunos eosinófilos rodeados por fibrocitos y colágena. En la parte superior se observa un infiltrado celular de tipo agudo formado por neutrófilos, eosinófilos y algunos macrófagos.
- Fig. 16A.-** Corte histológico de pulmón de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 40 días p.i., teñido con H-E 10X. Se observa gran cantidad de células linfoides infiltradas en la pared bronquial y engrosamiento de los septos.
- Fig. 16B.-** Corte histológico de pulmón de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 40 días p.i., teñido con H-E 10X. Se observa un granuloma sin larva, septos alveolares engrosados y enfisema muy marcado.
- Fig. 16C.-** Corte histológico de pulmón de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 60 días p.i., teñido con H-E 10X. Se observa un granuloma en la parte media, en la parte inferior de éste se observa un infiltrado de macrófagos con hemosiderina. Las paredes alveolares están engrosadas, es notoria la hemorragia y el enfisema, así como el infiltrado de linfocitos.
- Fig. 16D.-** Corte histológico de pulmón de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 60 días p.i., teñido con H-E 10X. Esta microfotografía es un acercamiento de la anterior en donde se observa con mayor detalle los macrófagos con hemosiderina y el infiltrado linfocitario.

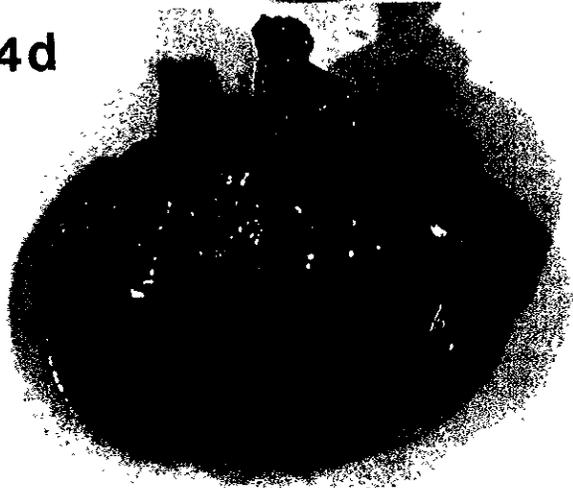




14b .



14d



14e



14f



60



15C



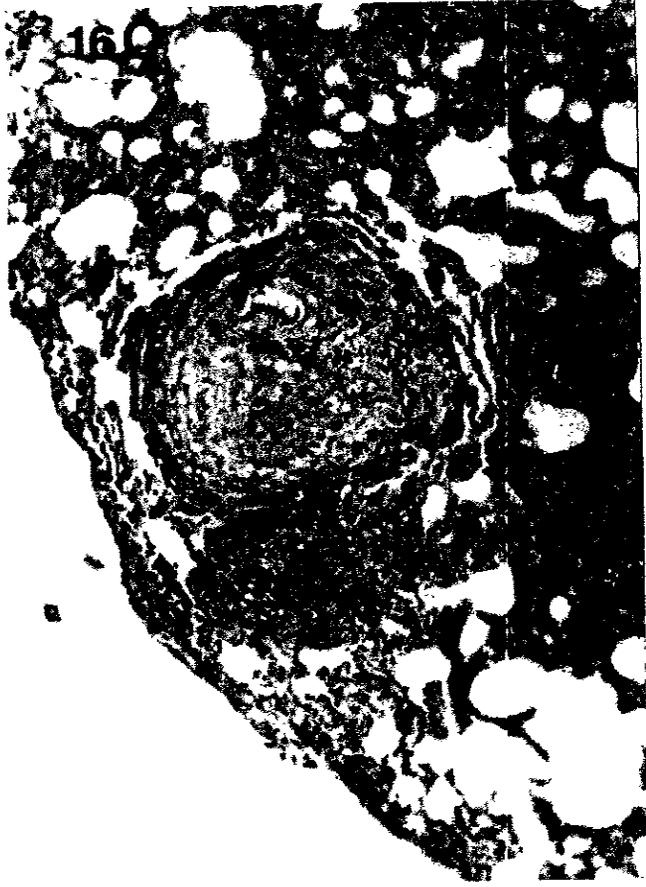
15D



16A



16C



16D



## **Cambios patológicos presentes en hígado de jerbos inoculados experimentalmente con 1000 hITc.**

La secuencia de lesiones macroscópicas observadas en hígados de los jerbos sacrificados a diferentes se presentan en el cuadro 21. El día 1 p.i. no se presentaron cambios patológicos aparentes. Los días 3, 5 y 10 p.i. los hígados presentaron hemorragias o congestión sobre la superficie. La mayoría de los hígados de los jerbos sacrificados los días 20 y 30 p.i. presentaron únicamente puntos blancos sobre la superficie. Seis hígados de los animales sacrificados los días 40 y 60 p.i. presentaron puntos blancos sobre la superficie y seis presentaron menor peso que los hígados de los jerbos testigos (cuadro 21).

Microscópicamente los hígados de los jerbos sacrificados el día 1 p.i. no presentaron cambios patológicos. Los sacrificados el día 3 p.i. presentaron microscópicamente tres tipos de alteraciones, la primera son áreas con piconosis y necrosis coagulativa cerca de vasos sanguíneos (figura 17C), la segunda fueron zonas hemorrágicas con infiltrados de células inflamatorias con o sin larvas (fig.17D) y la tercera fueron algunas larvas sin ningún tipo de reacción inflamatoria alrededor (figuras 17A y 17B). Durante todo el experimento se observaron que hepatocitos tanto de jerbos no inoculados como de jerbos inoculados, presentaban diferente tamaño de núcleos (poliploidia).

Los hígados de los jerbos sacrificados el día 5 p.i. presentaron alrededor de las larvas una fuerte reacción inflamatoria aguda con infiltrado de neutrófilos y algunos eosinófilos así como hemorragias (figura 18A, 18B y 18D). Así mismo, se presentaron larvas sin respuesta inflamatoria (figuras 18C).

Los hígados de los jerbos sacrificados el día 10 p.i. presentaron zonas granulomatosas formadas por neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, linfocitos y células epiteliales alrededor, la mayoría de estas lesiones no presentaron ninguna larva. Otras zonas presentaron lesiones difusas con eritrocitos, neutrófilos y eosinófilos.

Los hígados de los jerbos sacrificados los días 20 y 30 p.i. presentaron granulomas con fibroblastos, neutrófilos, macrófagos y linfocitos (figura 20D), muy pocos de estos granulomas presentaron larvas dentro, solo en un hígado se observó una lesión granulomatosa con una larva en proceso de destrucción el día 20 p.i. (figura 19A). Algunas

larvas sin ningún tipo de reacción inflamatoria se observaron fuera de los granulomas que presentaban fibrosis (figura 20C). También se observaron algunas zonas con tejido de reparación y macrófagos con hemosiderina, éstas generalmente se presentaron cerca de vasos sanguíneos (figuras 19D y 20A).

Los hígados de los jerbos sacrificados los días 40 y 60 p.i. presentaron granulomas similares a los del día 20 y 30 p.i.. Se observaron zonas de reparación con macrófagos con hemosiderina que se localizaron generalmente cerca de los vasos sanguíneos, en el espacio porta o en de la superficie (figuras 21A, 21B, 21C y 21D) lo cual provoco una deformación de la estructura normal del hígado. Algunos hígados presentaron escasos focos de inflamación aguda con infiltrados de neutrófilos y eosinófilos pero sin células epiteliodes o fibroblastos.

### **Cambios patológicos presentes en riñones de jerbos inoculados experimentalmente con 1000 hITc.**

La secuencia de lesiones macroscópicas observadas en riñones de jerbos inoculados con hITc se presentan en el cuadro 22, en esta se observa que los riñones de los animales sacrificados entre las 24 y 72 horas p.i. no mostraron ningún cambio patológico aparente. A nivel microscópico no se detectaron larvas, sólo cambios vasculares, hiperemia (congestión) y hemorragias de poca magnitud en la mayor parte de los animales.

El día 5 los riñones de un jerbo presentaban macroscópicamente pequeñas zonas blancas difusas sobre el parénquima renal, el resto no presentó cambios aparentes. Todos los riñones de los jerbos sacrificados del día 10 al 60 presentaron macroscópicamente puntos blancos similares difusos sobre la superficie (figura 22A). La mayoría de los riñones del día 30 al 60 presentaron adherencias a la pared abdominal (Cuadro 22).

Los riñones de los jerbos sacrificados el día 5 presentaron microscópicamente cambios vasculares con hiperemia y hemorragias, glomerulos hinchados y atrofiados con hemorragias. Así mismo, se observaron focos de inflamación aguda con infiltrado celular formado por neutrófilos y eosinófilos. En algunos cortes se detectaron larvas sin respuesta inflamatoria (figura 22C) o dentro de las zonas de infiltrado y en vasos sanguíneos trombosados (figura 22B). A los 10 días p.i. los riñones presentaron microscópicamente

túbulos hemorrágicos, rodeados de exudado celular principalmente de neutrófilos y eosinófilos (figura 23C). Así mismo, se presentaron lesiones de tipo granulomatoso con fibroblastos y colágena, también se encontraron algunas larvas dentro de los focos de exudado celular (figura 22D).

En los riñones de los jerbos sacrificados el día 20 p.i. se observó hiperemia, algunas hemorragias, glomérulos hinchados y atrofiados. En la luz de los túbulos renales se observó descamación y una sustancia amorfa que borra los detalles histológicos subyacentes de las paredes vasculares y la sustituye por un depósito acelular, amorfo y de color rosa (figura 23D), en otras zonas se presentan granulomas con fibrocitos, macrófagos y algunos eosinófilos o neutrófilos (figura 23A).

En los riñones del día 30 se observaron tres tipos de lesiones, la más frecuente fue una lesión crónica con fibrocitos, macrófagos con hemosiderina, linfocitos y tubulos en reparación, en ocasiones neutrófilos en el centro de la lesión (figuras 24A y 24B). Con menos frecuencia se observó una lesión de tipo agudo con infiltrado celular de neutrófilos y eosinófilos ocasionalmente con la larva dentro. Finalmente y con menos frecuencia se observó una lesión crónica con fibrocitos rodeando una larva con un acumulo de eosinófilos dentro, algunos linfocitos y neutrófilos que rodean la lesión (figuras 24C y 24D). Sobre la superficie se observaron depresiones y tejido fibroso cubriendo la superficie (figura 25A).

En los riñones de los jerbos sacrificados los días 40 y 60 p.i. se observaron principalmente lesiones crónicas de tipo abscedativo con fibroblastos, colágena, macrófagos con hemosiderina, restos celulares, algunos linfocitos y neutrófilos. Algunos túbulos con procesos de reparación y células en mitosis (figura 25D). Además, se presentó glomerulitis y engrosamiento generalizado de las membranas basales lo cual se confirmó por una tinción de P.A.S.. Sobre la superficie se presentaron depresiones con tejido de fibroso y macrófagos con hemosiderina (estas zonas corresponden a los puntos blancos observados sobre la superficie) (figura 25C). En algunos riñones se detectaron escasos focos de inflamación aguda con infiltrado de neutrófilos y eosinófilos.

La corteza renal fue la zona donde se encontraron las alteraciones en los diferentes días, en ningún caso se encontraron lesiones en médula renal.

DÍAS P.I.	S.C.P.A.	CONGESTIÓN	HEMORRAGIAS	PUNTOS BLANCOS	REDUCCIÓN DE TAMAÑO
1	5	0	0	0	0
3	0	4	1	0	0
5	0	4	2	0	0
10	2	3	0	0	0
20	0	3	0	5	0
30	2	0	0	3	0
40	1	0	0	3	3
60	1	0	1	3	3

**Cuadro 21.- Lesiones macroscópicas en hígado de jerbos inoculados intragástricamente con 1000 huevos larvados de *T. canis*. Cada uno de los días p.i. se sacrificaron 5 animales.**

**S.C.P.A.= sin cambios patológicos aparentes.**

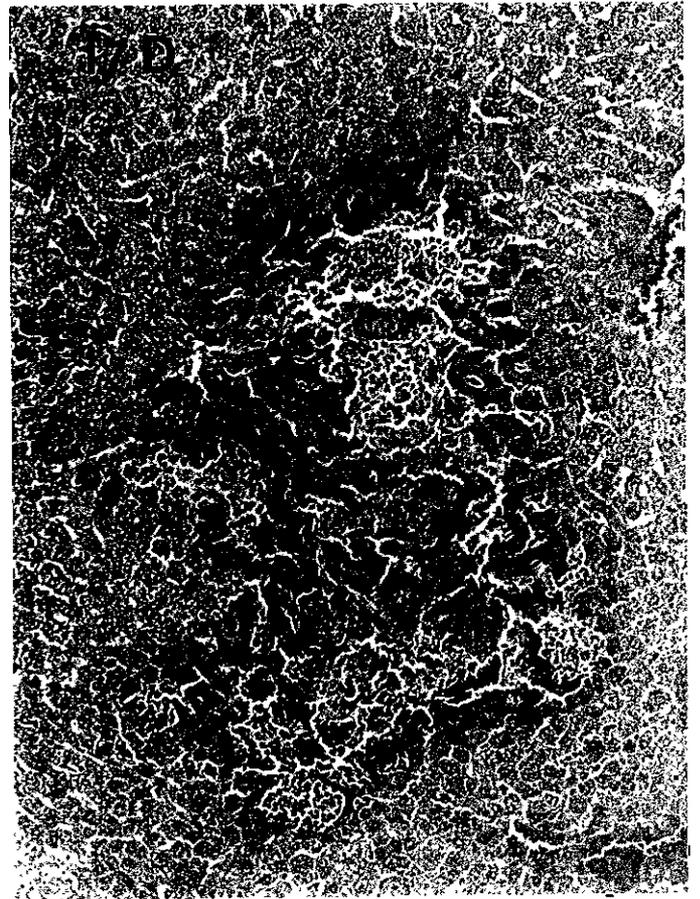
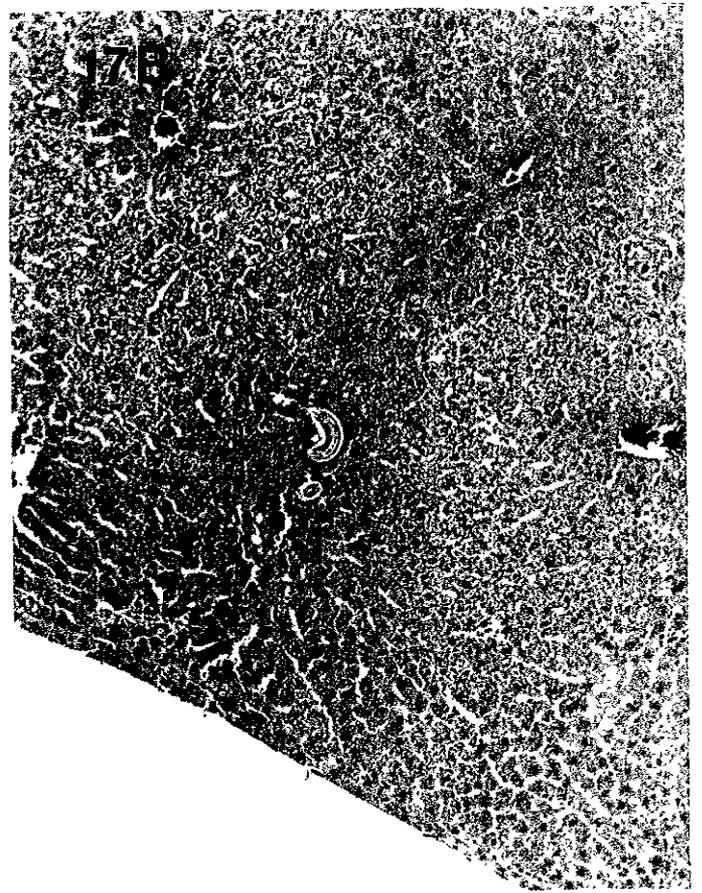
<b>DÍAS P.I.</b>	<b>S.C.P.A.</b>	<b>ADHERENCIAS</b>	<b>PUNTOS BLANCOS</b>	<b>REDUCIDOS DE TAMAÑO</b>
<b>1</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>3</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>5</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>10</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>0</b>
<b>20</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>0</b>
<b>30</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>0</b>
<b>40</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>0</b>
<b>60</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>3</b>

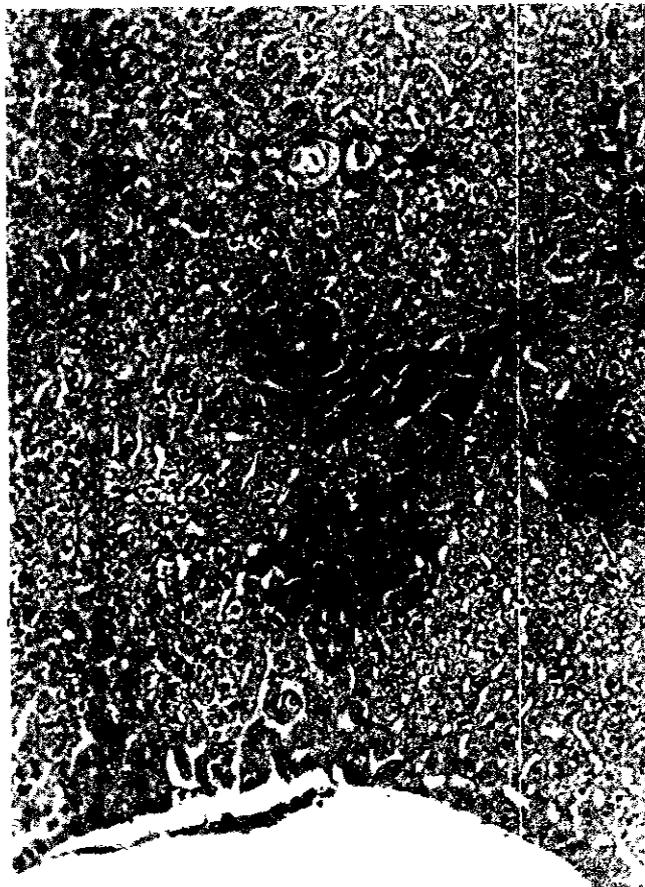
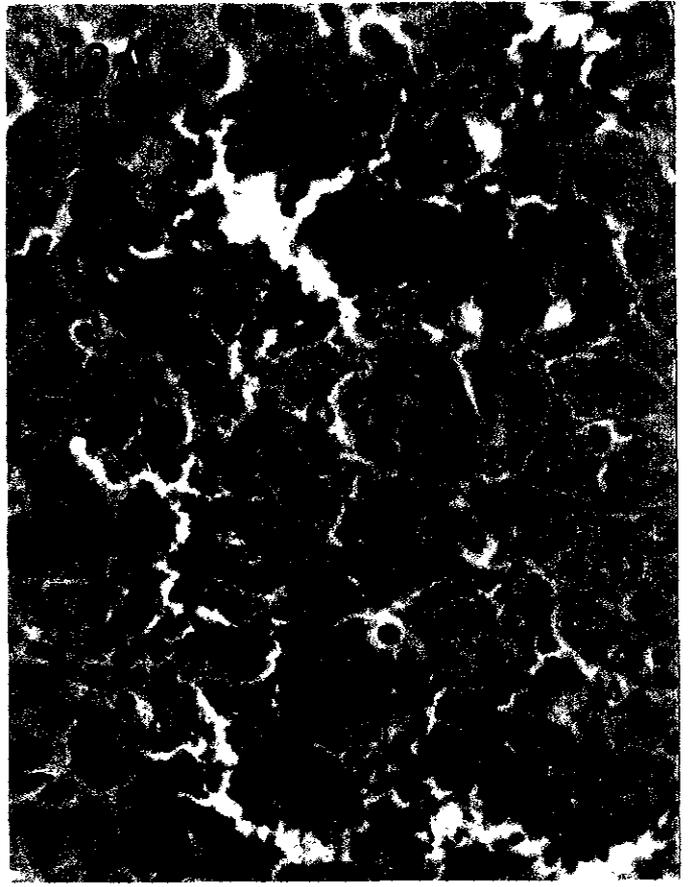
**Cuadro 22.- Lesiones macroscópicas en riñones de jerbos inoculados intragástricamente con 1000 huevos larvados de *T. canis*. Cada uno de los días p.i. se sacrificaron 5 animales.**

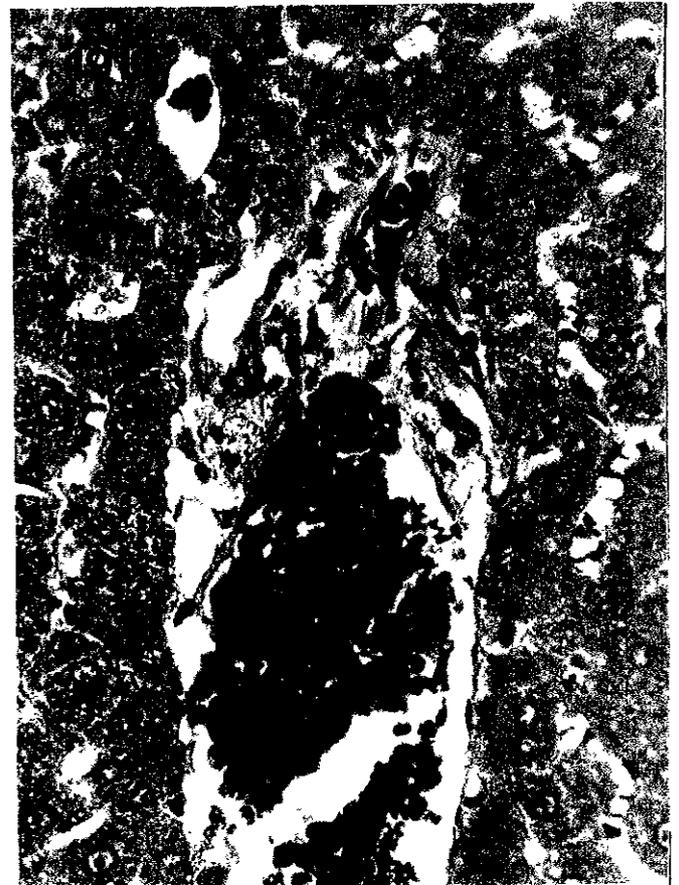
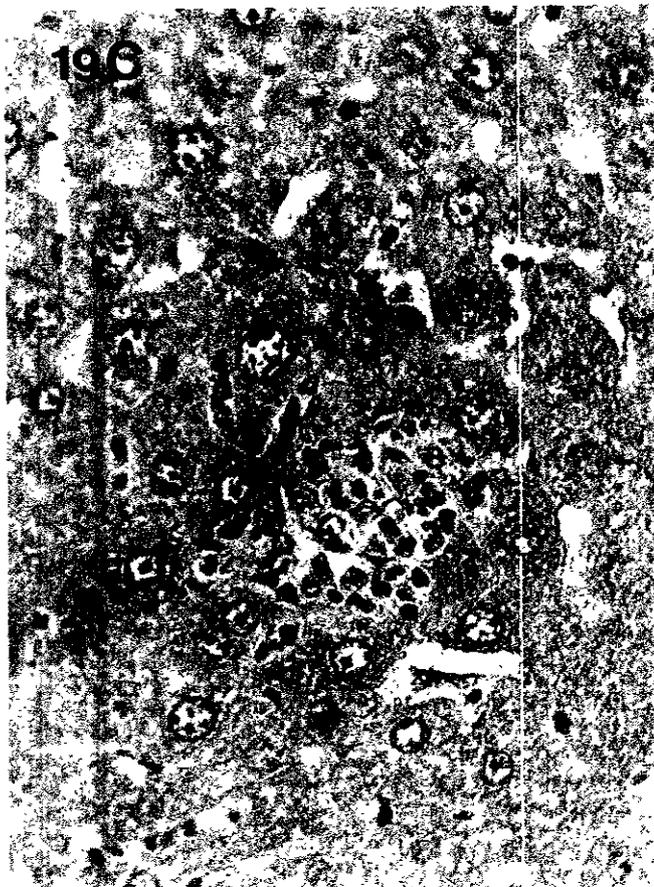
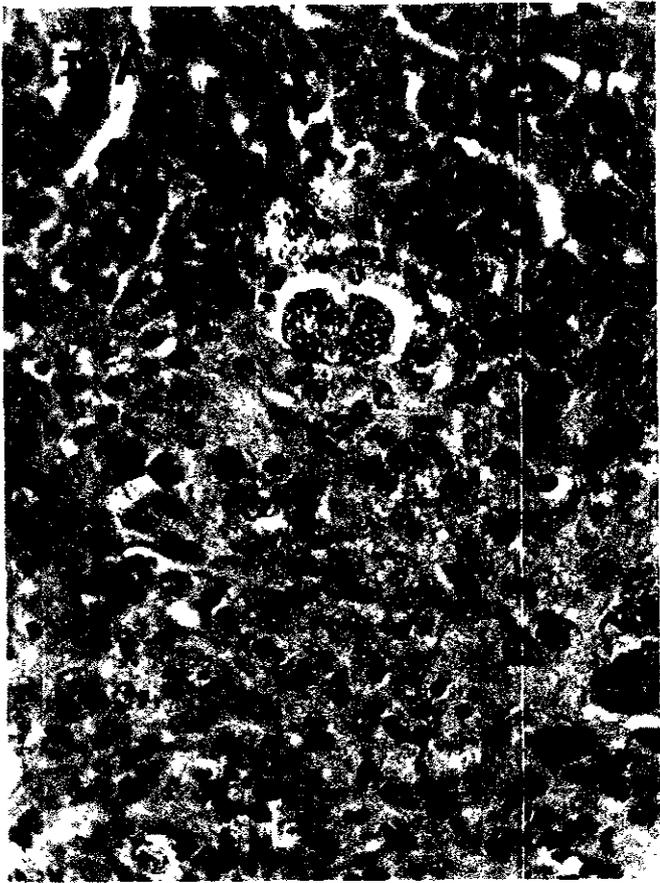
**S.C.P.A.= sin cambios patológicos aparentes**

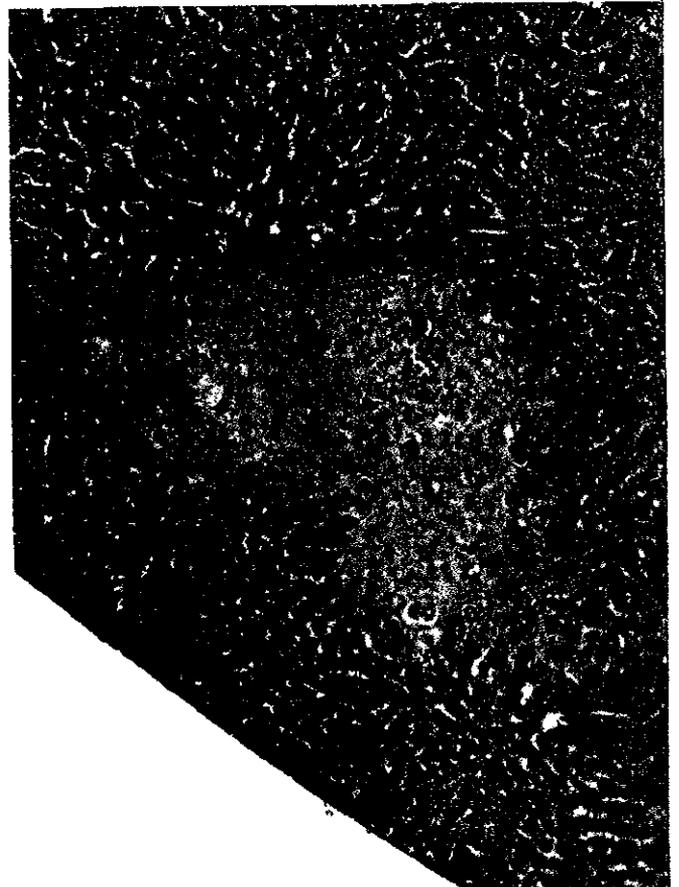
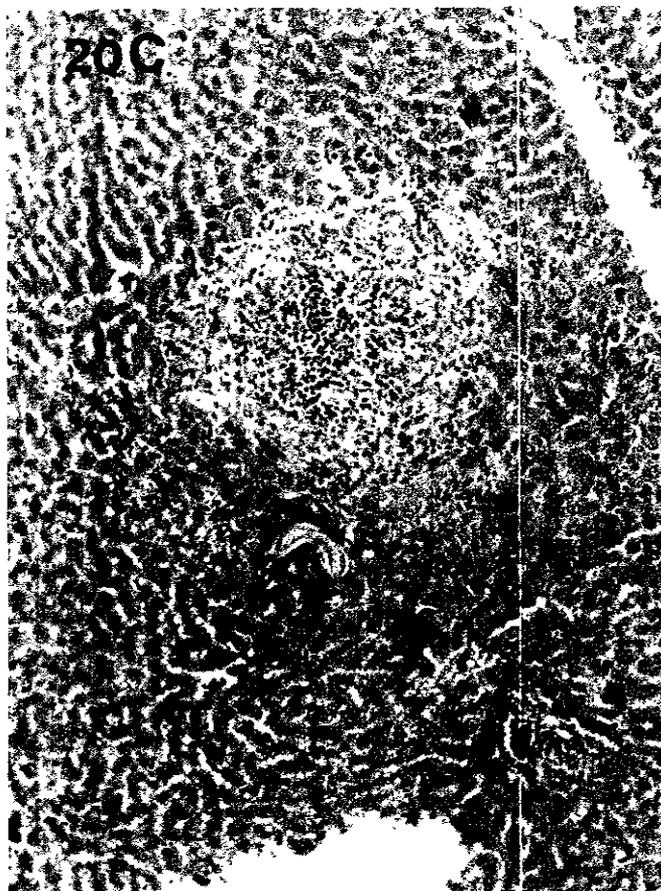
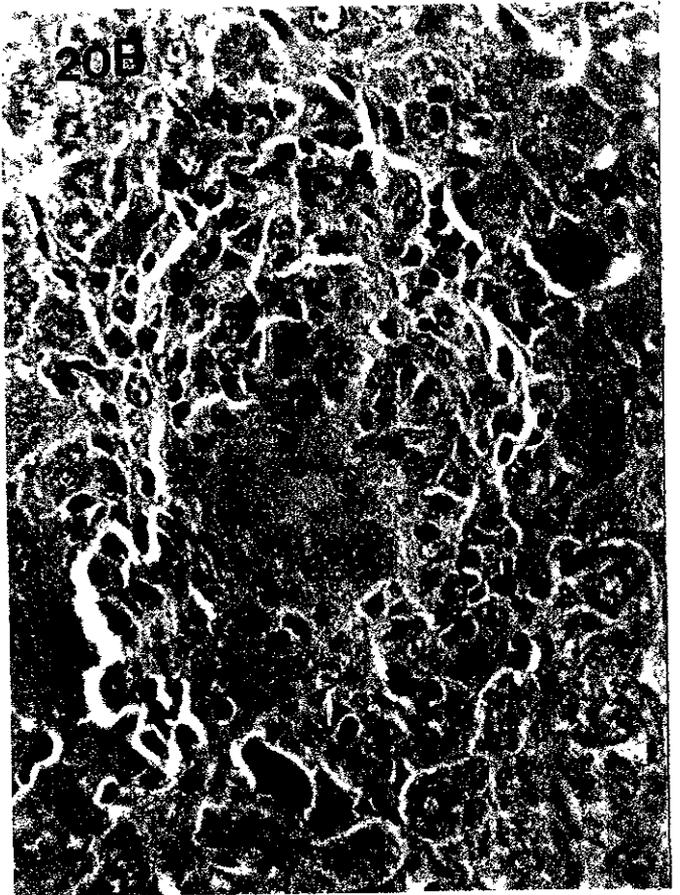
- Fig. 17A.- Corte histológico de hígado de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 3 días p.i., teñido con H-E 40X. La microfotografía muestra un acercamiento de la siguiente figura y es una larva aparentemente intacta sin infiltrado inflamatorio cerca. Se observa cierto grado de poliploidia en hepatocitos.
- Fig. 17B.- Corte histológico de hígado de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 3 días p.i., teñido con H-E 10X. Se observa una larva sin ningún tipo de respuesta inflatoria cerca.
- Fig. 17C.- Corte histológico de hígado de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 3 días p.i., teñido con H-E 40X. Se observa un vaso porta y un canalículo biliar rodeados por una zona de picnosis y necrosis coagulativa.
- Fig. 17D.- Corte histológico de hígado de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 3 días p.i., teñido con H-E 10X. Se observa una zona con fuerte hemorragia y ligero infiltrado de neutrófilos.
- Fig. 18A.- Corte histológico de hígado de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 5 días p.i., teñido con H-E 10X. Se observa una zona hemorrágica con infiltrado de neutrófilos y eosinófilos, no hay larva presente. Es notoria la poliploidia.
- Fig. 18B.- Corte histológico de hígado de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 5 días p.i., teñido con H-E 40X. Acercamiento de la microfotografía presentada en la fig. 18A, se observan neutrófilos y eosinófilos.
- Fig. 18C.- Corte histológico de hígado de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 5 días p.i., teñido con H-E 10X. Se observan tres áreas hemorrágicas, con necrosis e infiltrado de neutrófilos y eosinófilos por donde probablemente migró una larva. En la parte superior se observa una larva sin respuesta inflamatoria y algo de necrosis.
- Fig. 18D.- Corte histológico de hígado de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 5 días p.i., teñido con H-E 40X. Se observa una larva aparentemente intacta con un fuerte infiltrado de neutrófilos, además de algunos eosinófilos y eritrocitos alrededor.
- Fig. 19A.- Corte histológico de hígado de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 20 días p.i., teñido con H-E 40X. Se observa una larva parcialmente destruida rodeada por macrófagos, linfocitos, neutrófilos y algunos eosinófilos, en una lesión de tipo granulomatoso.
- Fig. 19B.- Corte histológico de hígado de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 3 días p.i., teñido con H-E 100X. Acercamiento de la microfotografía anterior, se observan neutrófilos, linfocitos, algunos macrófagos y eosinófilos.

- Fig. 19C.- Corte histológico de hígado de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 20 días p.i., teñido con H-E 40X. Infiltrado mielopoyetico con neutrófilos y linfocitos. Poliploidia evidente.
- Fig. 19D.- Corte histológico de hígado de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 30 días p.i., teñido con H-E 40X. En esta microfotografía se presenta tejido de reparación y macrófagos con hemosiderina alrededor de los vasos sanguíneos.
- Fig. 20A.- Corte histológico de hígado de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 40 días p.i., teñido con H-E 40X. Tejido de reparación alrededor de un vaso sanguíneo. Poliploidia evidente.
- Fig. 20B.- Corte histológico de hígado de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 40 días p.i., teñido con H-E 40X. Se observa un canaliculo biliar rodeado de eosinófilos, macrófagos y linfocitos.
- Fig. 20C.- Corte histológico de hígado de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 40 días p.i., teñido con H-E 10X. Se observa una lesión crónica con enutrófilos en el centro rodeados por fibrocitos y colágena. En la parte externa de la lesión hay infiltrado de linfocitos y neutrófilos. Por fuera de la reacción inflamatoria hay una larva aparentemente intacta sin ningún tipo de reacción.
- Fig. 20D.- Corte histológico de hígado de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 40 días p.i., teñido con H-E 10X. Se observa una lesión crónica con neutrófilos en el centro rodeados por fibrocitos y colágena.
- Fig. 21A.- Corte histológico de hígado de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 40 días p.i., teñido con H-E 10X. Se observa una depresión sobre la superficie y tejido de reparación con macrófagos y hemosiderina en la base de la lesión, la cápsula hepática (Glisson) engrosada y fibrosada cubriendo la depresión, este tipo de lesión corresponde a los puntos blancos que se observan macroscópicamente en la superficie.
- Fig. 21B.- Corte histológico de hígado de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 60 días p.i., teñido con H-E 10X. Se observan macrófagos con hemosiderina en el espacio porta.
- Fig. 21C.- Corte histológico de hígado de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 60 días p.i., teñido con H-E 10X. Se observa una depresión sobre la superficie y tejido de reparación con macrófagos y hemosiderina en la base de la lesión.
- Fig. 21D.- Corte histológico de hígado de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 60 días p.i., teñido con H-E 40X. Acercamiento de la microfotografía anterior. Se observan macrófagos con hemosiderina, eosinófilos y linfocitos en el espacio porta.





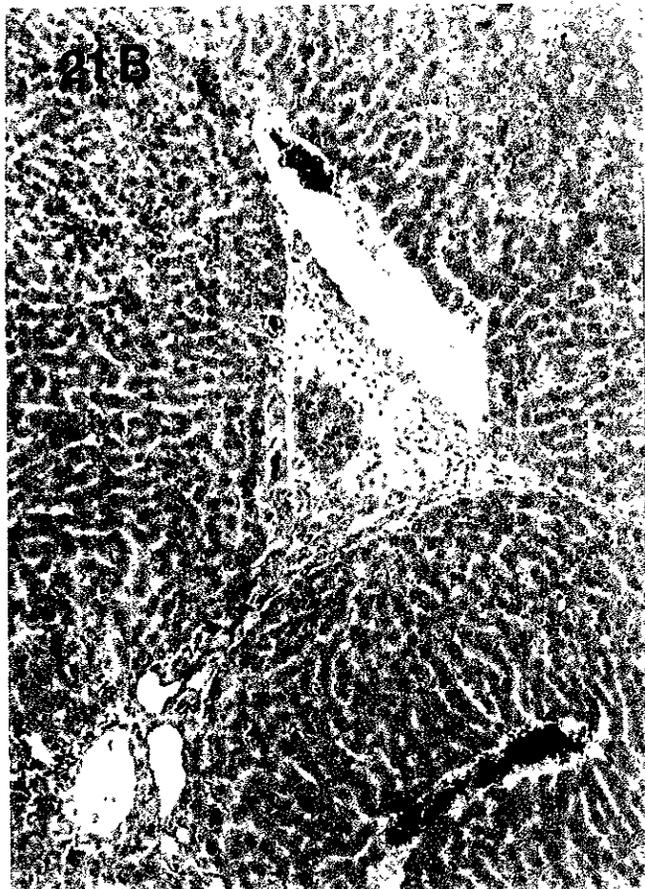




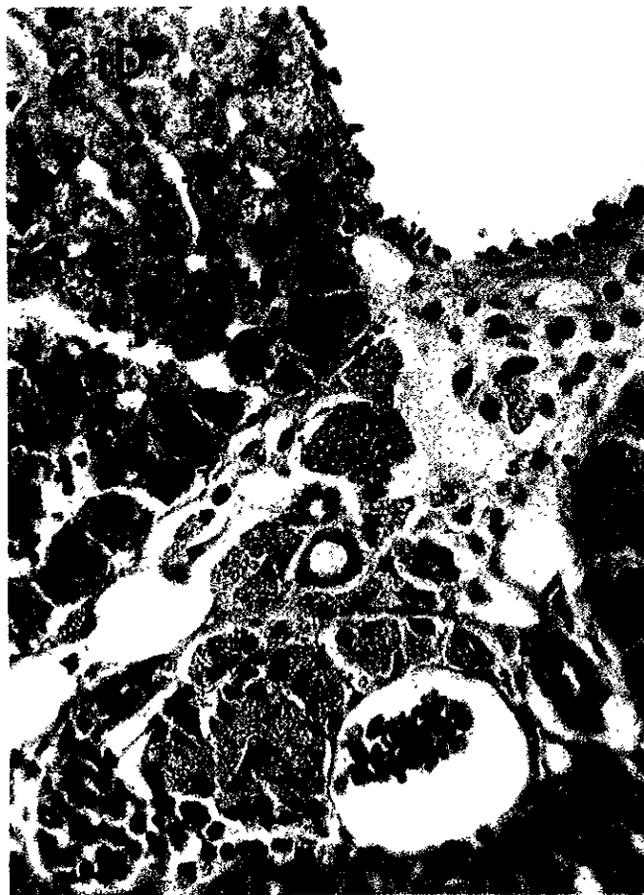
21A



21B



21C



- Fig. 22A.- Riñones de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificados a los 40 días p.i.. Se observan áreas blancas sobre la superficie.
- Fig. 22B.- Corte histológico de riñón de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificados a los 5 días p.i., teñido con H-E 40X. Se observa una larva dentro de un vaso sanguíneo y otro con trombosis.
- Fig. 22C.- Corte histológico de riñón de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificados a los 5 días p.i., teñido con H-E 40X. Se observa una larva y un infiltrado de neutrófilos y eosinófilos.
- Fig. 22D.- Corte histológico de riñón de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificados a los 10 días p.i., teñido con H-E 10X. Se observa una larva aparentemente intacta, rodeada de un infiltrado de neutrófilos, macrófagos y eosinófilos.
- Fig. 23A.- Corte histológico de riñón de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificados a los 20 días p.i., teñido con H-E 10X. El área del corte presenta una larva rodeada de infiltrado de neutrófilos, eosinófilos y macrófagos.
- Fig. 23B.- Corte histológico de riñón de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificados a los 20 días p.i., teñido con H-E 40X. Se observa material fibrinoide dentro de glomérulos renales y falta de definición de los detalles celulares.
- Fig. 23C.- Corte histológico de riñón de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificados a los 10 días p.i., teñido con H-E 10X. Se observa infiltrado de neutrófilos y eosinófilos, no se observan larvas. Los túbulos cercanos se presentan hemorrágicos.
- Fig. 23D.- Corte histológico de riñón de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificados a los 20 días p.i., teñido con H-E 40X. La microfotografía muestra un glomérulo inflamado y hemorrágico. En la luz de los túbulos cercanos hay descamación con material fibrinoide que se tiñe de rosa y borra los detalles histológicos y corresponden a restos necróticos de las células.
- Fig. 24A.- Corte histológico de riñón de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificados a los 30 días p.i., teñido con H-E 10X. Se observa infiltrado hemorrágico con

linfocitos, macrófagos y algunos neutrófilos. Se observa presencia de infiltrado de neutrófilos en túbulos cercanos a la lesión.

Fig. 24B.- Corte histológico de riñón de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificados a los 30 días p.i., teñido con H-E 10X. Se observa un granuloma sin presencia de larvas. Externamente se presenta aumento de fibroblastos e internamente una gran cantidad de neutrófilos y algunos eosinófilos. Algunos neutrófilos y linfocitos rodean la lesión. Se observa imágenes de reparación celular.

Fig. 24C.- Corte histológico de riñón de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificados a los 30 días p.i., teñido con H-E 10X. La microfotografía muestra el aparente atrapamiento de una larva con algunos eosinófilos, rodeados por varias cepas de fibrocitos. Algunos linfocitos y neutrófilos rodean la lesión.

Fig. 24D.- Corte histológico de riñón de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificados a los 40 días p.i., teñido con H-E 40X. Acercamiento de la microfotografía anterior, Se observa la larva aparentemente intacta y eosinófilos rodeados por fibrocitos. Estas estructuras corresponden a los puntos blancos observados a la necropsia.

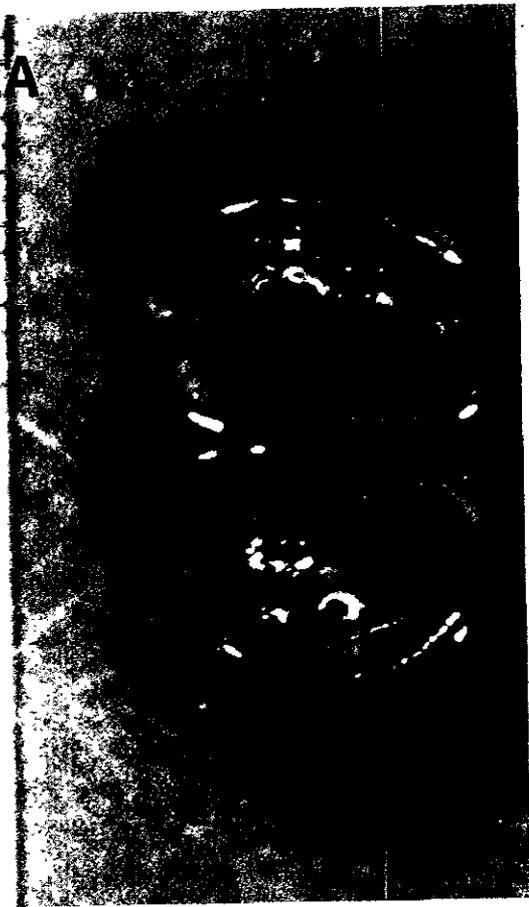
Fig. 25A.- Corte histológico de riñón de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificados a los 30 días p.i., teñido con H-E 10X. Se observa una depresión con fibrosis sobre la superficie del riñón, cerca no hay tejido de reparación solo ligero infiltrado de neutrófilos y eosinófilos.

Fig. 25B.- Corte histológico de riñón de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificados a los 40 días p.i., teñido con H-E 10X. Se observa en la superficie del riñón una depresión con fibrosis, cerca de esta lesión hay infiltrado de linfocitos, fibrocitos y macrófagos con hemosiderina.

Fig. 25C.- Corte histológico de riñón de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificados a los 60 días p.i., teñido con H-E 40X. Se observa en la superficie del riñón una depresión con algo de colágena, estas lesiones corresponden a los puntos blancos observados macroscópicamente sobre la superficie del riñón. En el parénquima por debajo de la depresión hay tejido de reparación y macrófagos con hemosiderina.

Fig. 25D.- Corte histológico de riñón de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificados a los 60 días p.i., teñido con H-E 40X. Se observa una estructura nodular fibrosa con fibroblastos (puede corresponder a la pared de un granuloma) sin infiltrado celular dentro, entre corteza y médula renal.

22A



22B



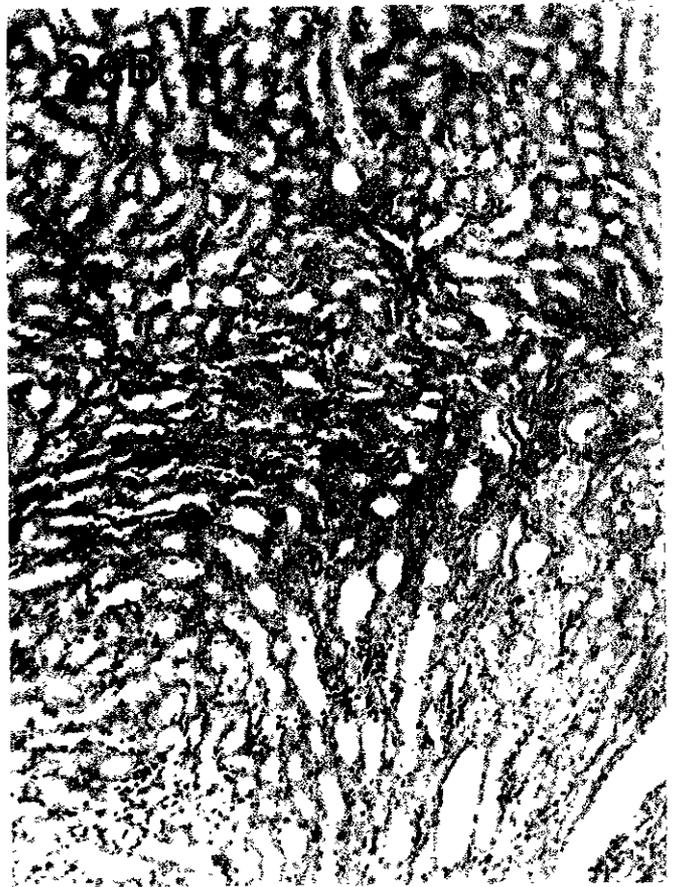
22D



23A



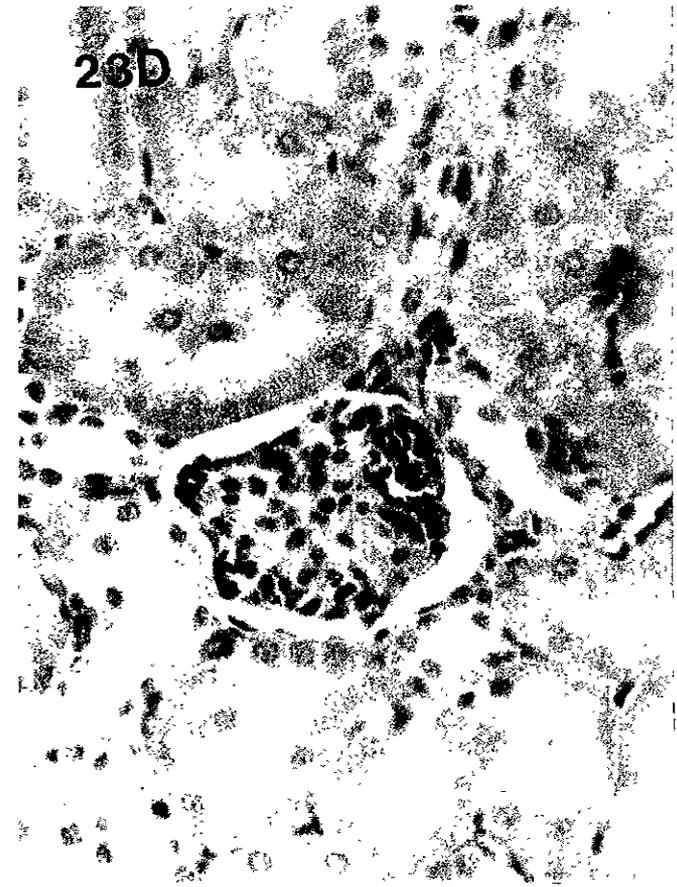
23B



28C



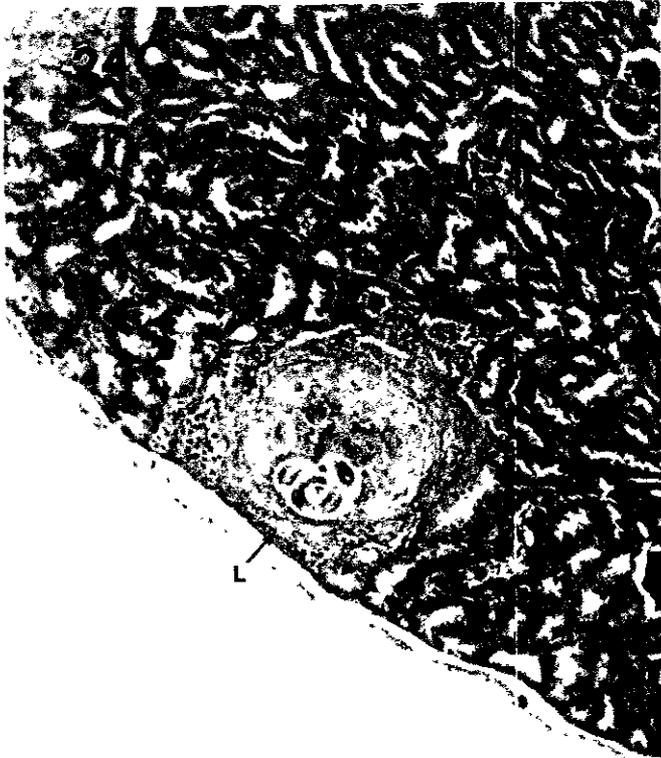
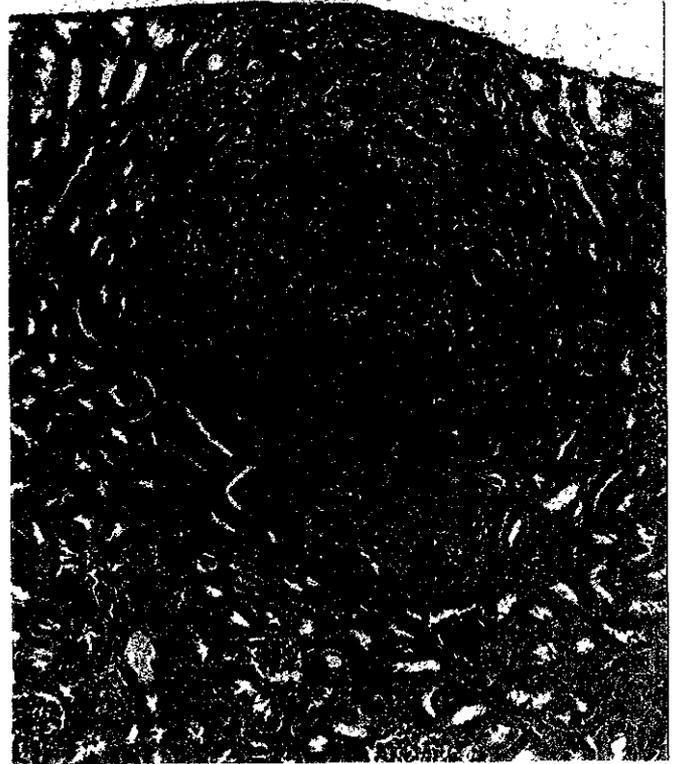
28D



24



24B



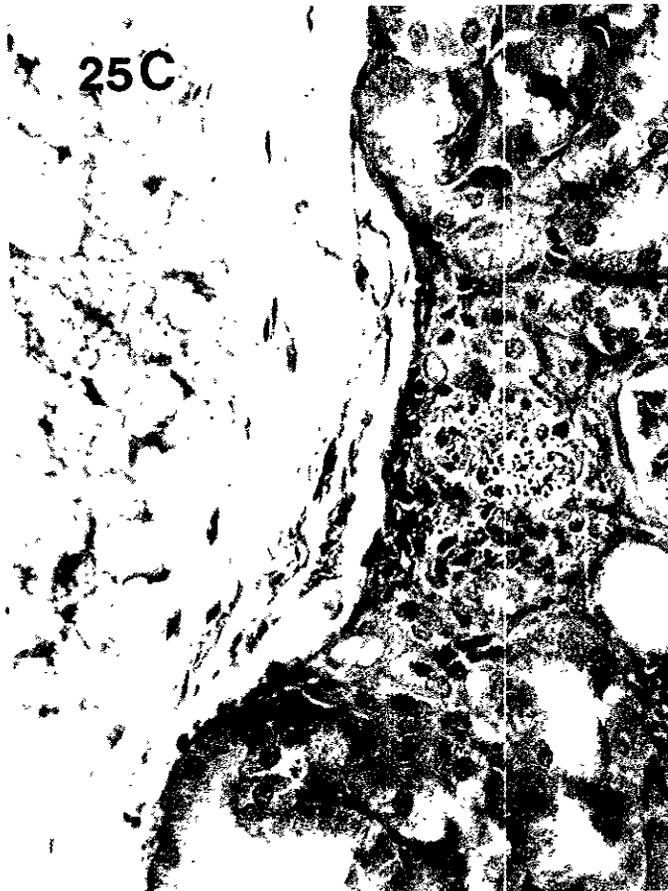
25A



25B



25C



## **Cambios patológicos observados en bazo de jerbos inoculados experimentalmente con 1000 hTc.**

La secuencia de lesiones macroscópicas observadas en bazo de los jerbos sacrificados a diferentes períodos de tiempo se presentan en el cuadro 24. Los días 1, 3, 30, 40 y 60 p.i. no presentaron ningún cambio patológico aparente. Algunos (9 de 15) bazos de los jerbos sacrificados los días 5, 10 y 20 p.i. presentaron un marcado aumento de tamaño (cuadro 24), más del doble de peso que los normales. Microscópicamente solo se observó un aumento de la actividad celular (figura 13c).

## **Cambios patológicos observados en cerebro de jerbos inoculados experimentalmente con 1000 hTc.**

La secuencia de lesiones macroscópicas observadas en cerebro de los jerbos sacrificados a diferentes se presentan en el cuadro 23. En los días 1, 3, 5 y 10 p.i. no se presentaron cambios patológicos aparentes, con la excepción de un cerebro con hemorragias el día 5 p.i.. Entre los días 20 y 60 p.i. la mayoría presentó congestión y hemorragias (figura 26A). Algunos cerebros obtenidos el día 20, y 60 p.i. presentaron adherencias meníngicas.

En los cerebros de los jerbos sacrificados los días 1, 3 y 5 p.i. no se observaron microscópicamente cambios patológicos aparentes. En los cerebros de los jerbos sacrificados el día 10 p.i. se encontraron larvas sin ninguna respuesta inflamatoria en diferentes partes del encéfalo y del cerebelo (figura 26C y 26D) y se detectaron además algunos focos hemorrágicos (figura 26B).

En los cerebros de los jerbos sacrificados el día 20 p.i. se observaron microscópicamente algunas larvas sin respuesta inflamatoria (figuras 27A y 27B) y ligero infiltrado de neutrófilos y eosinófilos alrededor de algunos vasos sanguíneos.

Los cerebros de los jerbos sacrificados el día 30 p.i. presentaron vasos con infiltrado de mononucleares y eosinófilos (figuras 27C y 27D). Algunas larvas se encontraron en el espacio perivascular (Virchow-Robin) asociados con ligeros infiltrados de neutrófilos y monocitos (figura 28B y 28C). Una larva se encontró en el conducto de Sylvio sin provocar aparentemente ninguna alteración (figura 28D) otro cerebro presento infiltrado celular con una larva cerca del conducto de Sylvio (28A). Se observaron otras larvas sin ningún tipo de reacción cerca de ellas.

En los cerebros de los jerbos sacrificados el día 40 p.i. se detectaron zonas con fuerte infiltrado de monocitos y linfocitos (figura 30A), algunos vasos sanguíneos presentaron “manguitos perivascuales” formados principalmente por linfocitos (figura 29A), también se observaron zonas de degeneración (figura 29A) y algunas larvas sin ningún tipo de respuesta inflamatoria.

El día 60 se observaron larvas en zonas de degeneración que en algunos casos presentaron depósitos de calcio (figura 30B y 30C). Así mismo se continuaron detectando algunas larvas alrededor de las cuales no había aparentemente respuesta inflamatoria ni produjo degeneración (figura 29D). Algunos vasos sanguíneos presentaron manguitos perivascuales (figura 29B).

<b>DÍAS P.I.</b>	<b>S.C.P.A.</b>	<b>HEMORRAGIAS</b>	<b>ADHERENCIAS MENINGEAS</b>	<b>CONGESTIÓN</b>
<b>1</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>3</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>5</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>20</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>5</b>
<b>30</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>5</b>
<b>40</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
<b>60</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>3</b>

**Cuadro 23.- Lesiones macroscópicas en cerebro de jerbos inoculados intragástricamente con 1000 huevos larvados de *T. canis*. Cada uno de los días p.i. se sacrificaron 5 animales.**

**S.C.P.A.= sin cambios patológicos aparentes.**

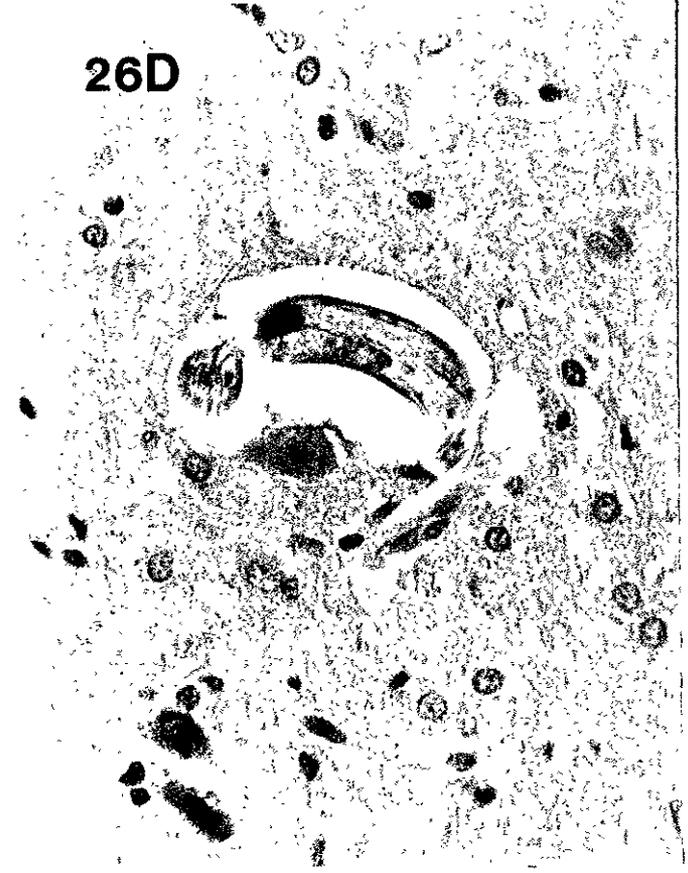
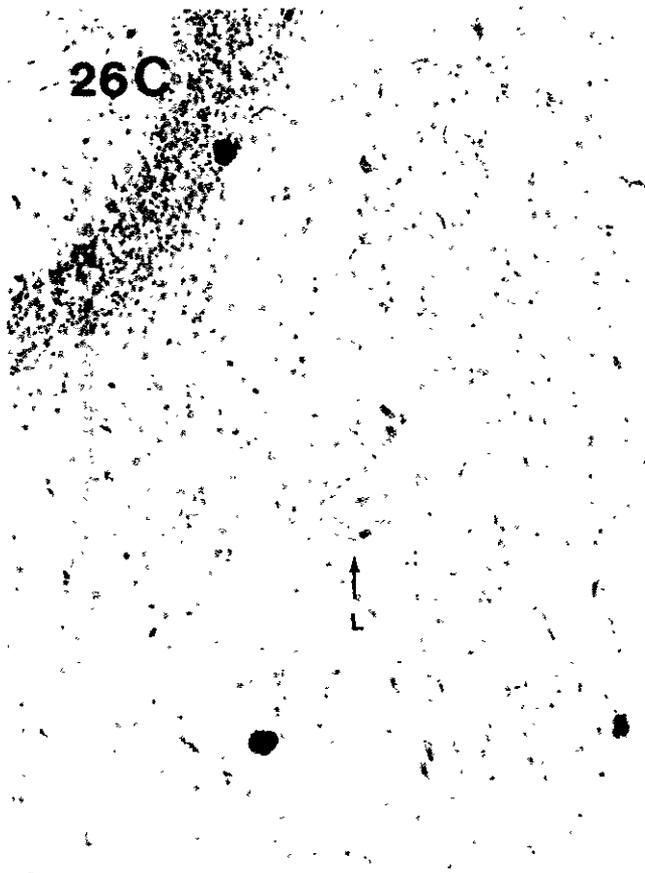
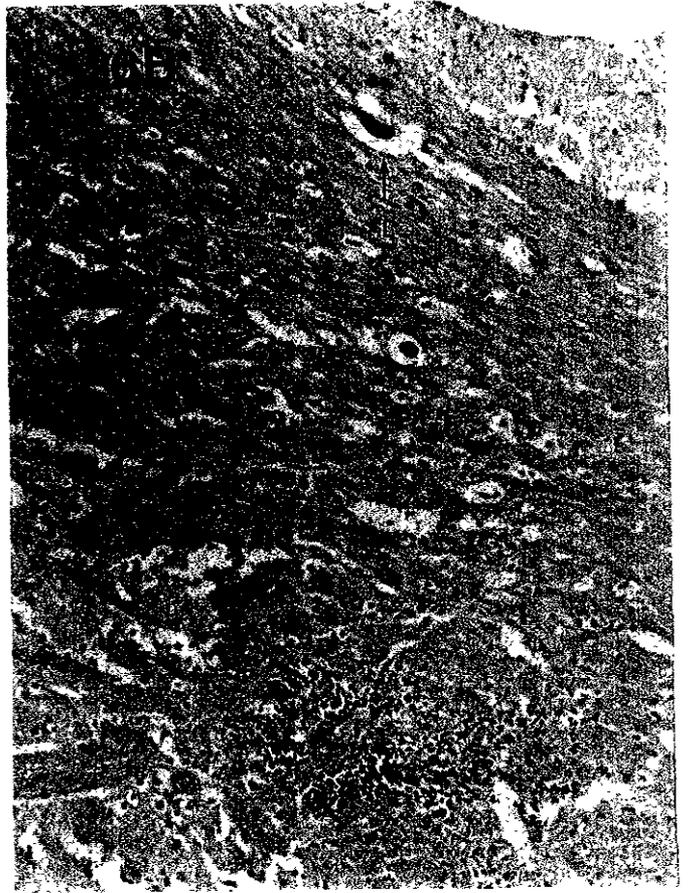
<b>DÍAS P.I.</b>	<b>S.C.P.A.</b>	<b>AUMENTO DE TAMAÑO</b>
1	5	0
3	5	0
5	0	5
10	2	3
20	4	1
30	5	0
40	5	0
60	5	0

**Cuadro 24.- Lesiones macroscópicas en bazo de jerbos inoculados intragástricamente con 1000 huevos larvados de *T. canis*. Cada uno de los días p.i. se sacrificaron 5 animales.**

**S.C.P.A.= sin cambios patológicos aparentes**

- Fig. 26A.- Cerebro de un jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 30 días p.i.. Se observa congestión y hemorragias sobre la superficie del cerebro y en meninges.
- Fig. 26B.- Corte histológico de cerebro de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 10 días p.i., teñidos con H-E 10X. En la parte inferior se observa una zona hemorrágica sin larvas. En la parte superior se observa una larva aparentemente intacta sin ningún tipo de respuesta inflamatoria.
- Fig. 26C.- Corte histológico de cerebro de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 10 días p.i., teñidos con H-E 10X. Se observa una larva sin ningún tipo de respuesta inflamatoria.
- Fig. 26 D.- Corte histológico de cerebro de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 10 días p.i., teñidos con H-E 10X. Acercamiento de una larva sin ningún tipo de respuesta inflamatoria.
- Fig. 27A.- Corte histológico de cerebelo de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 20 días p.i., teñidos con H-E 10X. Larva en la capa molecular, no se observa respuesta inflamatoria.
- Fig. 27C.- Corte histológico de cerebro de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 30 días p.i., teñidos con H-E 10X. Acercamiento de la microfotografía anterior, nótese que la larva esta aparentemente intacta y sin respuesta inflamatoria.
- Fig. 27D.- Corte histológico de cerebro de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 30 días p.i., teñidos con H-E 40X. Acercamiento de la microfotografía presentada en la fig. 27C, la larva esta aparentemente intacta y no hay respuesta sobre ella. El vaso sanguíneo cercano presenta infiltrado de mononucleares, neutrófilos y eosinófilos.
- Fig. 28A.- Corte histológico de cerebro de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 30 días p.i., teñidos con H-E 10X. Se observa un infiltrado junto al acueducto de silvio, en el centro de la lesión se observa una larva aparentemente intacta.
- Fig. 28B.- Corte histológico de cerebro de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 30 días p.i., teñidos con H-E 40X. Se observa una larva en el espacio de Virchow-Robin y un ligero infiltrado de monocitos.

- Fig. 28C.- Corte histológico de cerebro de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 30 días p.i., teñidos con H-E 40X. Se observa una larva en el espacio de Virchow-Robin y un ligero infiltrado de monocitos, neutrófilos y eosinófilos.
- Fig. 28D.- Corte histológico de cerebro de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 30 días p.i., teñidos con H-E 10X. Se observa una larva en el conducto de Silvio, no existe ningún tipo de respuesta inflamatoria con desprendimiento del epitelio coroideo.
- Fig. 29A.- Corte histológico de cerebro de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 40 días p.i., teñidos con H-E 10X. Se observa en la parte superior un vaso sanguíneo con infiltrado perivascular. En la parte media hay una zona de degeneración con gliosis e infiltrado con eosinófilos.
- Fig. 29B.- Corte histológico de cerebro de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 40 días p.i., teñidos con H-E 40X. Se observa el “manguito perivascular” alrededor del vaso sanguíneo, constituido por mononucleares.
- Fig. 29C.- Corte histológico de cerebro de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 60 días p.i., teñidos con H-E 40X. Se observa una larva en la sustancia blanca junto a la capa granulosa, sin ningún tipo de respuesta inflamatoria o degenerativa cerca.
- Fig. 29D.- Corte histológico de cerebro de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 60 días p.i., teñidos con H-E 10X. Se observa infiltrado perivascular formado por eosinófilos y mononucleares.
- Fig. 30A.- Corte histológico de cerebro de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 60 días p.i., teñidos con H-E 10X. Se observan zonas con degeneración, vacuolas y vasos con manguito perivascular.
- Fig. 30B.- Corte histológico de cerebro de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 60 días p.i., teñidos con H-E 10X. Se observan dos larvas en una zona con necrosis licuefactiva y vacuolización.
- Fig. 30C.- Corte histológico de cerebro de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 60 días p.i., teñidos con H-E 40X. La microfotografía muestra una larva en una zona con degeneración y depósitos de calcio.
- Fig. 30D.- Corte histológico de cerebro de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 60 días p.i., teñidos con H-E 10X. En la parte superior derecha se observa una larva sin respuesta inflamatoria, se aprecian larvas en degeneración con vacuolización y vasos con “manguito perivascular”.



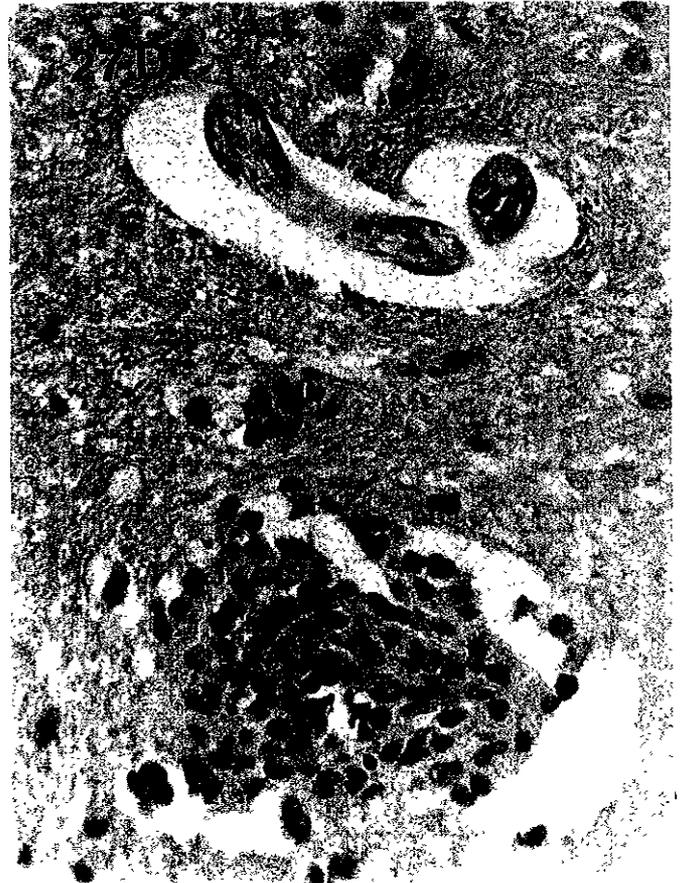
27A

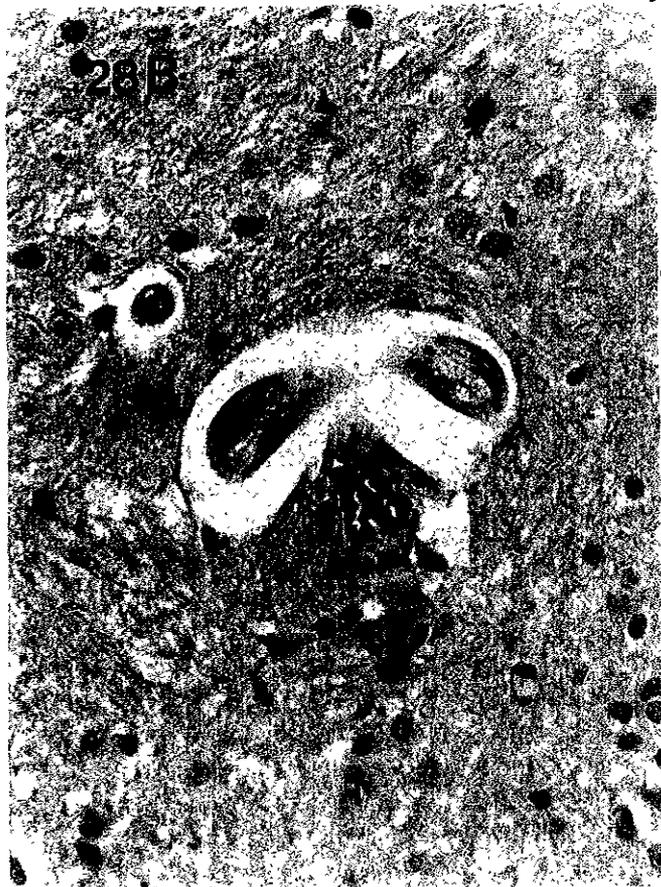


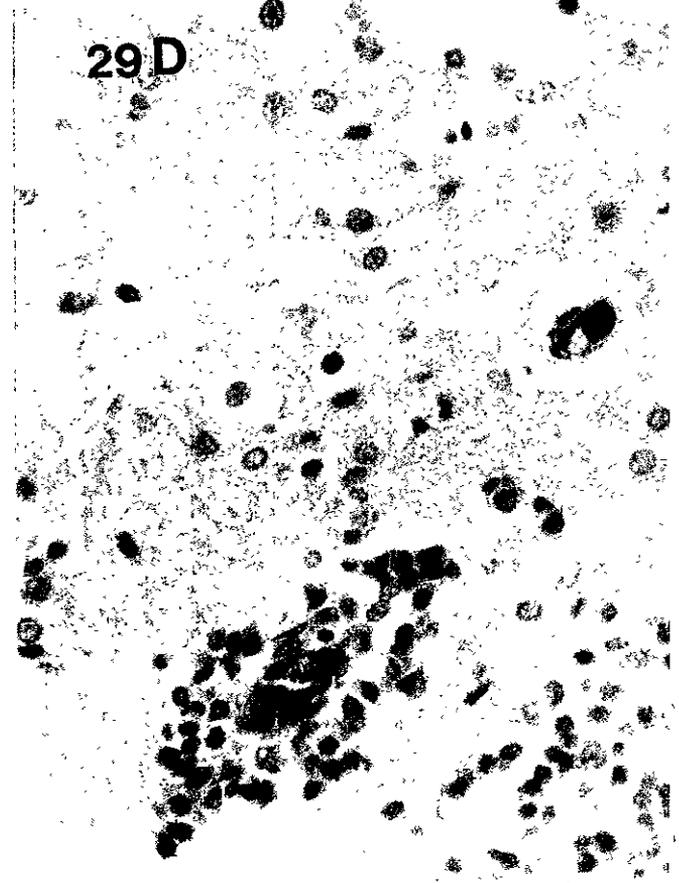
27B

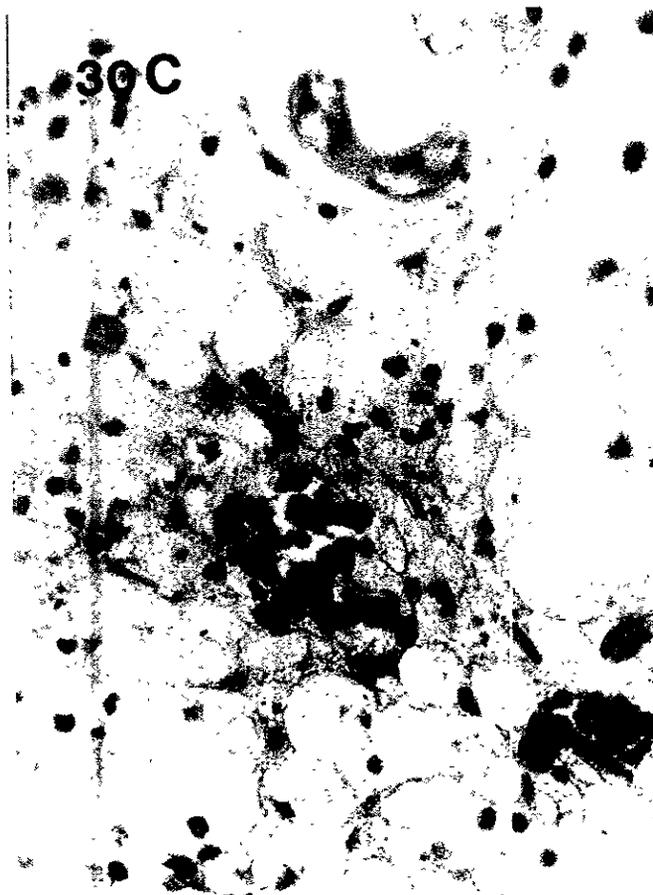
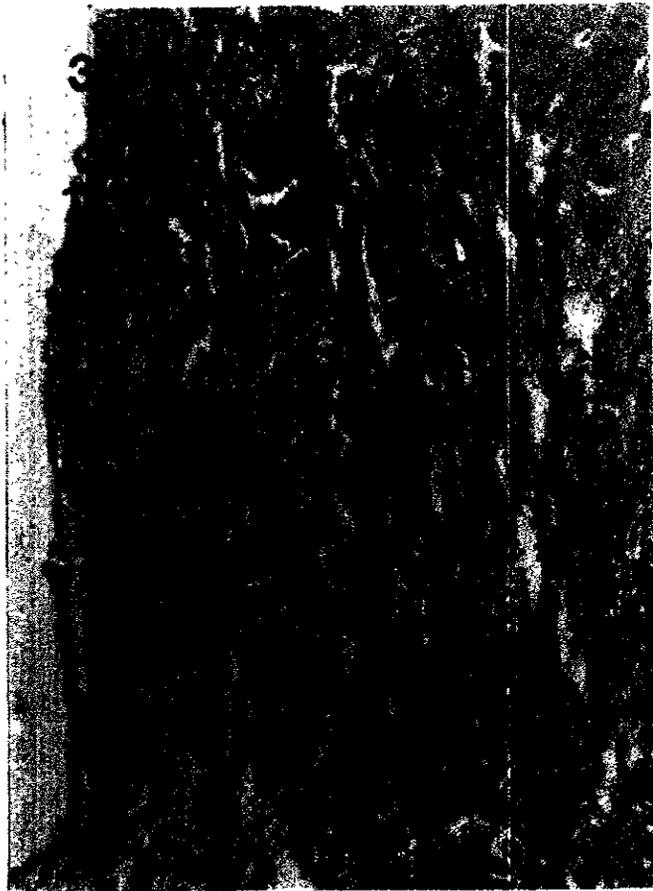


27C









## **Cambios patológicos observados en tejido muscular de jerbos inoculados experimentalmente con 1000 hITc.**

En el momento del sacrificio no se detectaron macroscópicamente cambios patológicos aparentes en tejido muscular cardiaco o esquelético en ninguno de los jerbos inoculados.

En músculo esquelético de los jerbos sacrificados los días 1, 3, y 5 no se presentaron microscópicamente cambios patológicos aparentes. El día 10 se observaron larvas dentro de fibras musculares sin respuesta inflamatoria circundante (figura 31A). El día 20 las larvas se observaron rodeadas de neutrófilos, macrófagos y pocos eosinófilos dentro del espacio de fibra muscular (larva 31B).

Los días 30 y 40 un gran número de lesiones tienden a la cronicidad y se encontraron fibrocitos rodeando las larvas (figura 31C). En algunos casos se presentaron infiltrados agudos de neutrófilos y eosinófilos con o sin larvas (32A). Así mismo se detectaron algunos granulomas en el tejido conectivo de los músculos (figuras 32B y 32C).

El músculo esquelético de los jerbos sacrificados el día 60 presentó lesiones crónicas caracterizadas por larvas “aparentemente vivas” rodeadas de fibrocitos en el tejido conectivo de los músculos (figura 31 D)

En músculo cardiaco de los jerbos sacrificados los días 1 y 3 no se presentaron microscópicamente cambios patológicos aparentes. Entre los días 5 y 10 se detectaron larvas sin respuesta inflamatoria (figura 32D). Entre los días 20 y 30 se presentaron zonas con infiltrados de neutrófilos y eosinófilos (figura 33A), pero se observaron muy pocas larvas. El día 40 las lesiones presentaron neutrófilos y macrófagos rodeados de fibrocitos (figura 33B). El día 60 se presentaron zonas con inflamación crónica caracterizada por una respuesta proliferativa de fibrocitos, algunas de estas lesiones presentaron larvas o neutrófilos en el centro (figura 33C), y en tejido conectivo se observó gran cantidad de fibrina y macrófagos con hemosiderina dentro (figura 33D).

## **Cambios patológicos observados en testículos de jerbos inoculados experimentalmente con 1000 hlTc.**

En los cortes de testículos no se observaron formas larvarias, aunque del día 30 al 60 p.i. se presentaron túbulos seminíferos con alteraciones en el epitelio germinal de diferentes magnitud, desde casos con evidente ausencia de la mayor parte de las células hasta casos con cambios sutiles en la onda espermática.

Fig. 31A.- Corte histológico de tejido muscular estriado de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 10 días p.i., teñido con H-E 40X. Se observa una larva dentro de una fibra muscular sin ningún tipo de reacción inflamatoria.

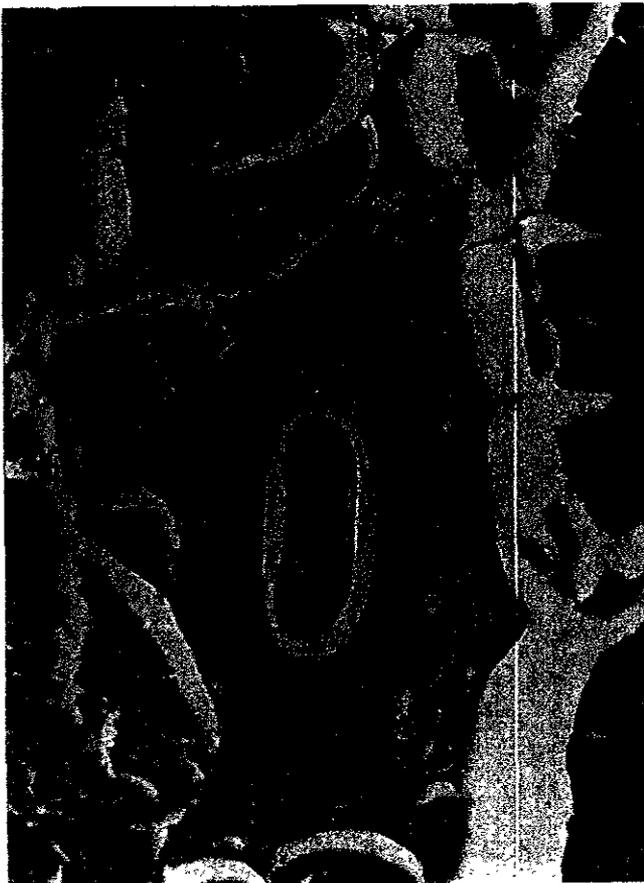
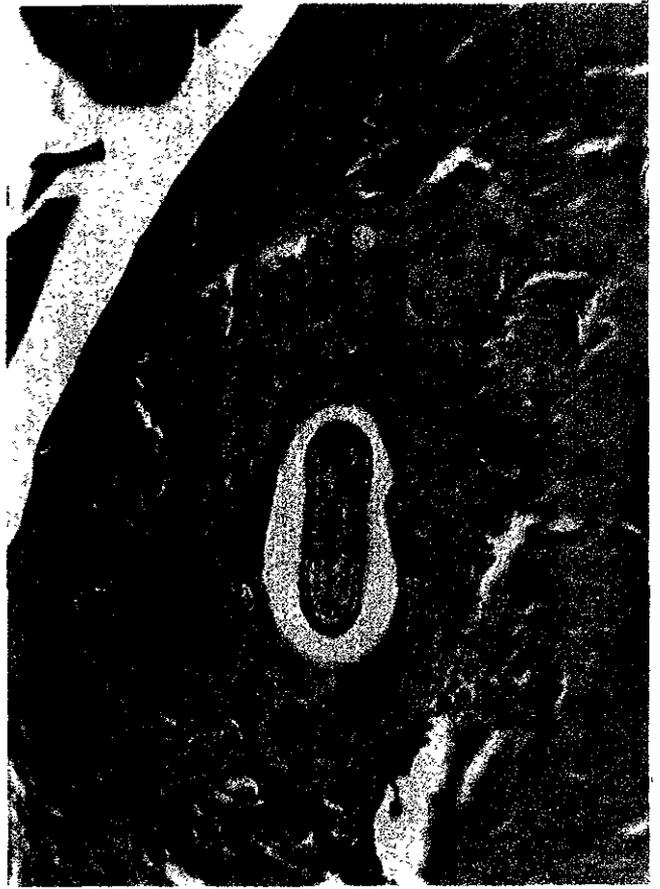
Fig. 31B.- Corte histológico de tejido muscular estriado de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 20 días p.i., teñido con H-E 40X. Se observa una larva aparentemente intacta, la cual esta rodeada de neutrófilos y macrófagos.

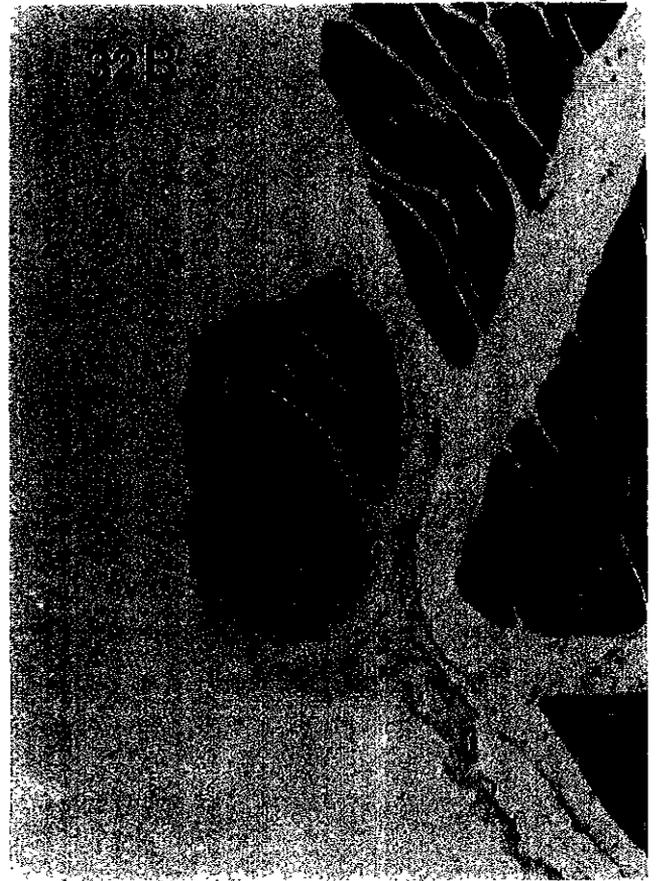
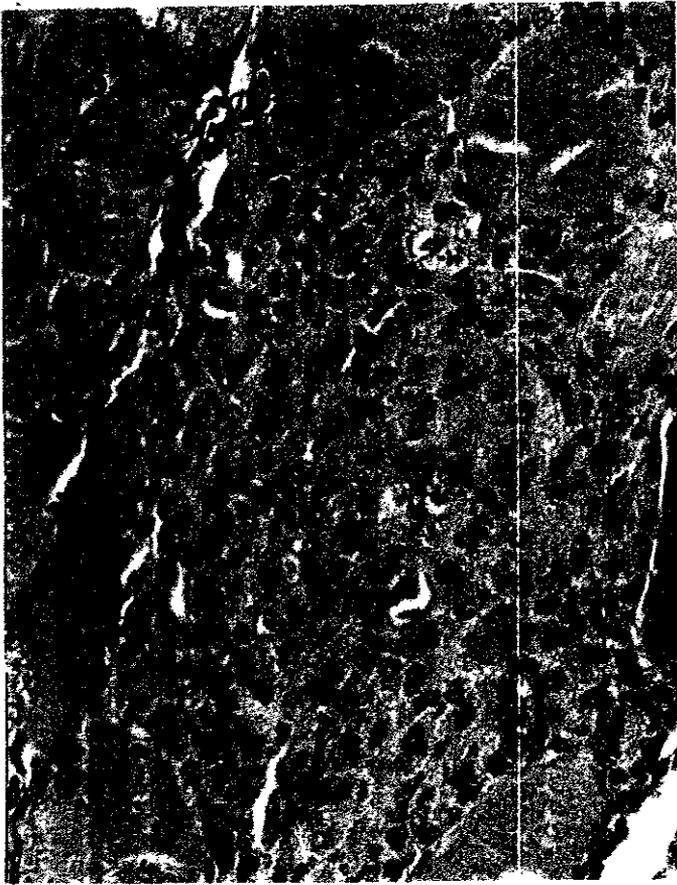
Fig. 31C.- Corte histológico de tejido muscular estriado de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 30 días p.i., teñido con H-E 40X. Se observa una larva rodeada por macrófagos y fibroblastos.

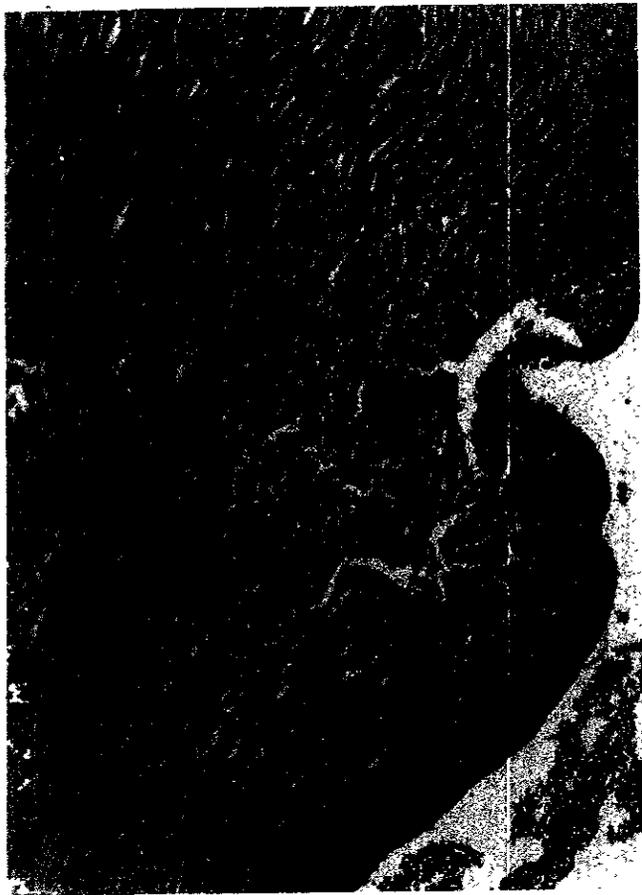
Fig. 31D.- Corte histológico de tejido muscular estriado de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 60 días p.i., teñidos con H-E 40X. La microfotografía muestra una larva aparentemente intacta y rodeada por macrófagos, fibrocitos y colagená.

Fig. 32A.- Corte histológico de tejido muscular estriado de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 40 días p.i., teñido con H-E 40X. Esta microfotografía muestra un granuloma con macrófagos, fibroblastos y eosinófilos.

- Fig. 32B.- Corte histológico de tejido muscular estriado de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificados a los 40 días p.i., teñido con H-E 10X. Se observa una larva dentro de un granuloma en tejido conjuntivo que rodea las fibras musculares (perimisiso).
- Fig. 32C.- Corte histológico de tejido muscular estriado de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificados a los 40 días p.i., teñido con H-E 40X. Acercamiento de la microfotografía anterior, la larva se observa rodeada de células mononucleares, macrófagos y fibroblastos.
- Fig. 32D.- Corte histológico de tejido muscular cardiaco de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificados a los 10 días p.i., teñido con H-E 10X. Se observa una larva en el centro de la microfotografía, no hay ningún tipo de respuesta inflamatoria.
- Fig. 33A.- Corte histológico de tejido muscular cardiaco de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 20 días p.i., teñido con H-E 10X. En la parte central de esta microfotografía se observa una zona con infiltrado de neutrófilos y eosinófilos.
- Fig. 33B.- Corte histológico de tejido muscular cardiaco de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 10 días p.i., teñido con H-E 40X. En la parte central se observa un infiltrado formado por neutrófilos y eosinófilos rodeados por fibrocitos.
- Fig. 33C.- Corte histológico de tejido muscular cardiaco de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 60 días p.i., teñido con H-E 10X. Se observa un granuloma con neutrófilos rodeados por fibrocitos y fibrina.
- Fig. 33D.- Corte histológico de tejido muscular cardiaco de jerbo inoculado con 1000 hITc sacrificado a los 60 días p.i., teñido con H-E 40X. Se observa tejido conectivo y macrófagos con hemosiderina.







## **Cambios patológicos observados en ojos de jerbos inoculados experimentalmente con 1000 hITc.**

Los jerbos sacrificados entre el día 1 y 20 p.i. no presentaron ninguna alteración en párpados, sin embargo 10 de los 15 jerbos sacrificados entre el día 30 y 60 p.i. presentaron edema palpebral en el momento del sacrificio. Una vez enucleados los ojos ninguno de los animales sacrificados presentó macroscópicamente cambios patológicos aparentes.

Microscópicamente no se presentaron alteraciones en los ojos de los jerbos sacrificados entre el día 1 y 5 p.i.. En dos de los jerbos cuyos ojos se analizaron el día 10 y 3 de los analizados el día 20 se observaron larvas en coroides sin ningún tipo de reacción inflamatoria (figura 34A y 34B), 2 ojos de los jerbos analizados el día 10 p.i. y en uno de los analizados el día 20 se observó larvas con hemorragias en procesos ciliares (figura 34C).

El día 30 p.i. 2 ojos presentaron larvas e infiltrado de neutrófilos en procesos ciliares (figura 34D), 2 presentaron larvas con hemorragias en la base de los procesos ciliares (figuras 34D y 35C), 2 presentaron una larva con hemorragia y edema en la capa pigmentada de la retina (Figura 35A,35B y 36B), un ojo presentó una larva en la capa limitante interna de la retina (figura 36A) y 2 presentaron larvas con edema entre la capa pigmentada y granulosa de la retina (figura 36C y 36D). Entre los jerbos sacrificados el día 20 y 60 p.i., se encontraron 5 con larvas sin respuesta inflamatoria en grasa anexa a los ojos (figura 35D).

El día 40 p.i. se observaron 2 ojos con larvas en zonas de retina destruidas y ligero infiltrado de neutrófilos y linfocitos (figura 37a y 37d), en uno se detectó una larva en capa granulosa externa de la retina (figura 37c), 2 ojos presentaron infiltrados de linfocitos en retina y humor acuoso sin presencia de larvas (figura 37b), un ojo presentó una larva con hemorragia y un granuloma cercano en formación en los procesos ciliares (figura 38a).

El día 60 p.i. 2 ojos presentaron una lesión granulomatosa en retina con infiltrado de linfocitos y monocitos además de una zona central con necrosis (figuras 39a y 39b), en otro ojo se observó una lesión granulomatosa en procesos ciliares con infiltrado de linfocitos y monocitos, en la parte lateral de la lesión se detectó tejido linfoide y en la parte central una zona de necrosis (figuras 38b, 38c y 38d). 3 ojos presentaron zonas con fuerte

hemorragia e infiltrado de linfocitos y monocitos en retina y humor acuoso (figuras 39c y 39d).

Fig. 34A.- Corte histológico de ojo de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 10 días p.i., teñido con H-E 10X. La microfotografía muestra una larva en un vaso sanguíneo de coroides sin ningún tipo de respuesta inflamatoria.

Fig. 34B.- Corte histológico de ojo de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 10 días p.i., teñido con H-E 40X. Acercamiento de la microfotografía anterior, nótese que no existe respuesta inflamatoria.

Fig. 34C.- Corte histológico de ojo de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 20 días p.i., teñido con H-E 10X. Se observa una larva con una ligera hemorragia entre los procesos ciliares.

Fig. 34D.- Corte histológico de ojo de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 30 días p.i., teñido con H-E 10X. Esta microfotografía muestra dos larvas, la primera en la base de los procesos ciliares (extremo inferior derecho). La segunda esta entre los procesos ciliares, nótese la hemorragia y el ligero infiltrado de neutrófilos.

Fig. 35A.- Corte histológico de ojo de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 30 días p.i., teñido con H-E 10X. La microfotografía presenta una larva en la capa pigmentada de la retina, se observa hemorragia y edema.

Fig. 35B.- Corte histológico de ojo de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 30 días p.i., teñido con H-E 40X. Acercamiento de la microfotografía anterior.

Fig. 35C.- Corte histológico de ojo de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 30 días p.i., teñido con H-E 10X. La microfotografía presenta una larva en la base de los procesos ciliares, se observa destrucción de tejido y hemorragia.

Fig. 35D.- Corte histológico de ojo de jerbo inoculado con 1000 hlTc y sacrificado a los 30 días p.i., teñido con H-E 10X. Se observa una larva sin respuesta inflamatoria en el tejido adiposo pardo periocular.

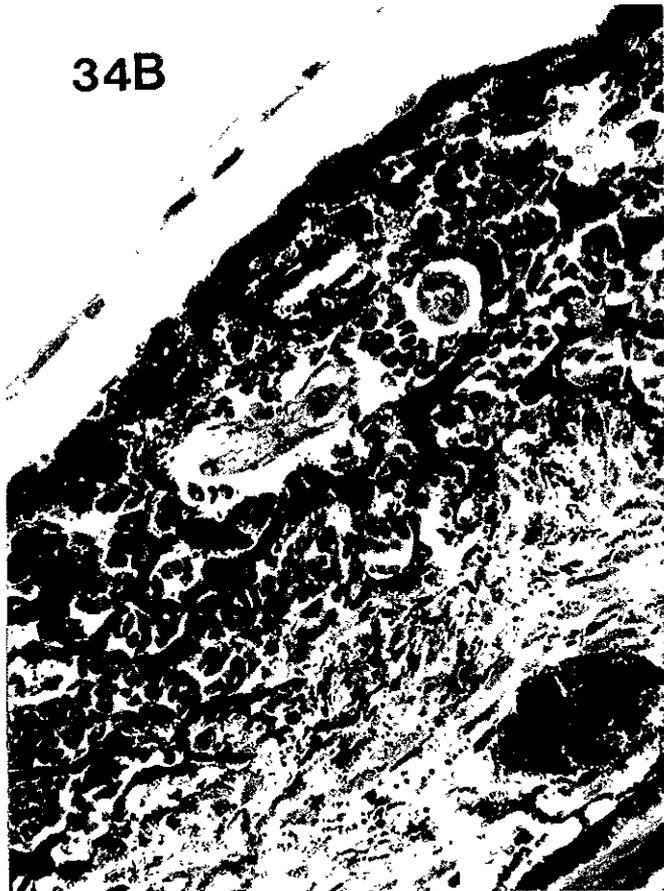
- Fig. 36A.- Corte histológico de ojo de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 30 días p.i., teñido con H-E 10X. La microfotografía muestra una larva en la capa limitante interna de la retina, se observa edema y ligero infiltrado de neutrófilos.
- Fig. 36B.- Corte histológico de ojo de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 30 días p.i., teñido con H-E 10X. Se observa una larva entre la capa pigmentada de la retina, hay edema entre la capa pigmentada y la capa granular de la retina.
- Fig. 36C.- Corte histológico de ojo de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 30 días p.i., teñido con H-E 10X. Se observa una larva entre la capa pigmentada y la capa granulosa de la retina, no hay respuesta inflamatoria cerca.
- Fig. 36D.- Corte histológico de ojo de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 30 días p.i., teñido con H-E 10X. Acercamiento de la microfotografía anterior.
- Fig. 37a.- Corte histológico de ojo de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 40 días p.i., teñido con H-E 10X. La microfotografía muestra una larva en una zona donde las capas de la retina están destruidas, se observa infiltrado de neutrófilos y linfocitos.
- Fig. 37b.- Corte histológico de ojo de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 40 días p.i., teñido con H-E 10X. La microfotografía muestra una zona donde se ha perdido la estructura clásica de la retina, hay edema entre la pigmentada y la granulosa. Se observa tejido destruido en la capa interna de retina, hay infiltrado de linfocitos en humor acuoso.
- Fig. 37c.- Corte histológico de ojo de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 40 días p.i., teñido con H-E 10X. La microfotografía muestra una larva en la capa granulosa externa de la retina. Se observa una fuerte hemorragia entre la capa interna de la retina y humor acuoso, se observa edema entre la capa granulosa y pigmentada de la retina.
- Fig. 37d.- Corte histológico de ojo de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 40 días p.i., teñido con H-E 10X. La microfotografía muestra una larva en el tejido destruido de la retina.

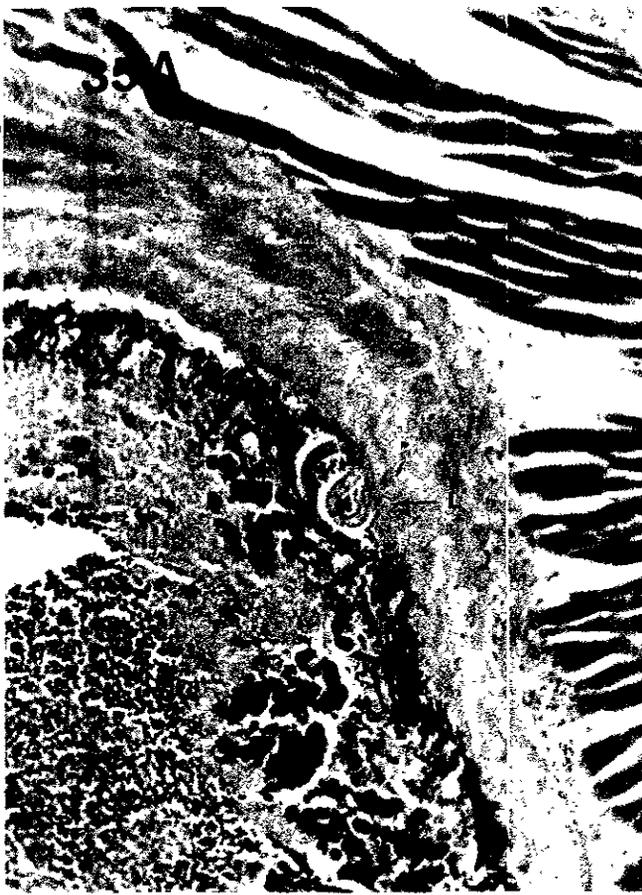
- Fig. 38a.- Corte histológico de ojo de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 40 días p.i., teñido con H-E 10X. Se observa una larva con hemorragia entre los procesos ciliares e infiltrado de neutrófilos y linfocitos.
- Fig. 38b.- Corte histológico de ojo de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 60 días p.i., teñido con H-E 10X. La microfotografía muestra un tejido aparentemente linfocitario junto a la base de los procesos ciliares, en la parte central hay una zona de necrosis y en la parte superior hay tejido que morfológicamente asemeja tejido linfoide. Se observa atrofia de los procesos ciliares.
- Fig. 38c.- Corte histológico de ojo de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 60 días p.i., teñido con H-E 40X. Acercamiento de la microfotografía anterior donde se muestra la zona de necrosis central.
- Fig. 38d.- Corte histológico de ojo de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 60 días p.i., teñido con H-E 10X. Acercamiento de la microfotografía 38a donde se observa el tejido de la lesión granulomatosa que morfológicamente es parecido a tejido linfoide.
- Fig. 39a.- Corte histológico de ojo de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 60 días p.i., teñido con H-E 10X. En la microfotografía se muestra una zona de hemorragia y degeneración en retina con infiltrado de linfocitos y monocitos y una zona central de necrosis. Se observa una fuerte hemorragia en la parte interna de la retina. No se detectaron larvas en esta área.
- Fig. 39b.- Corte histológico de ojo de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 60 días p.i., teñido con H-E 40X. Acercamiento de la microfotografía anterior en la zona central de la necrosis.
- Fig. 39c.- Corte histológico de ojo de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 60 días p.i., teñido con H-E 10X. La microfotografía muestra un abundante infiltrado de linfocitos y monocitos en la capa interna de retina y en humor acuoso, donde también se presenta hemorragia.
- Fig. 39d.- Corte histológico de ojo de jerbo inoculado con 1000 hITc y sacrificado a los 60 días p.i., teñido con H-E 4X. La microfotografía muestra un panorama general de un globo acular con una fuerte hemorragia interna y desorganización de la retina.

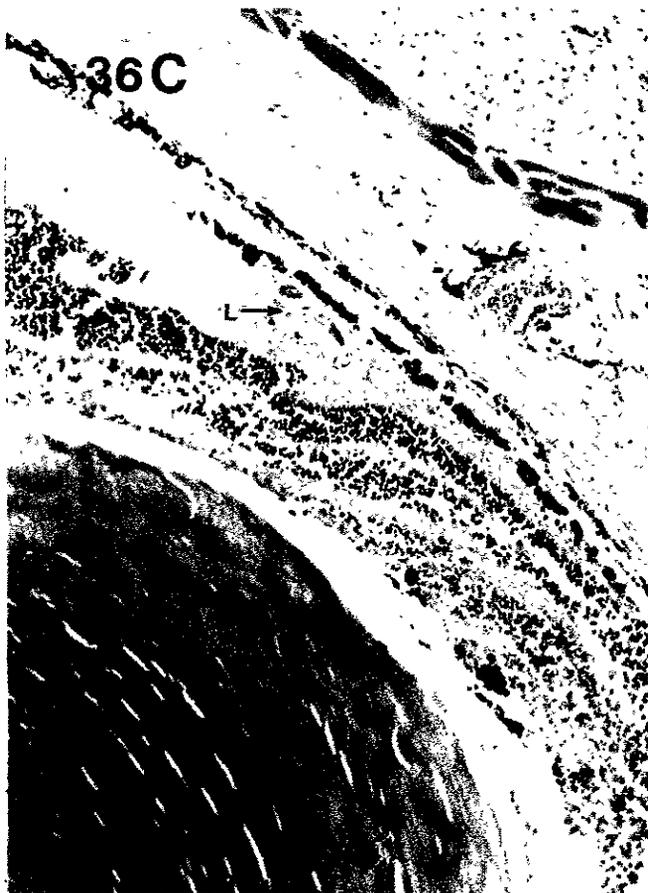
34A



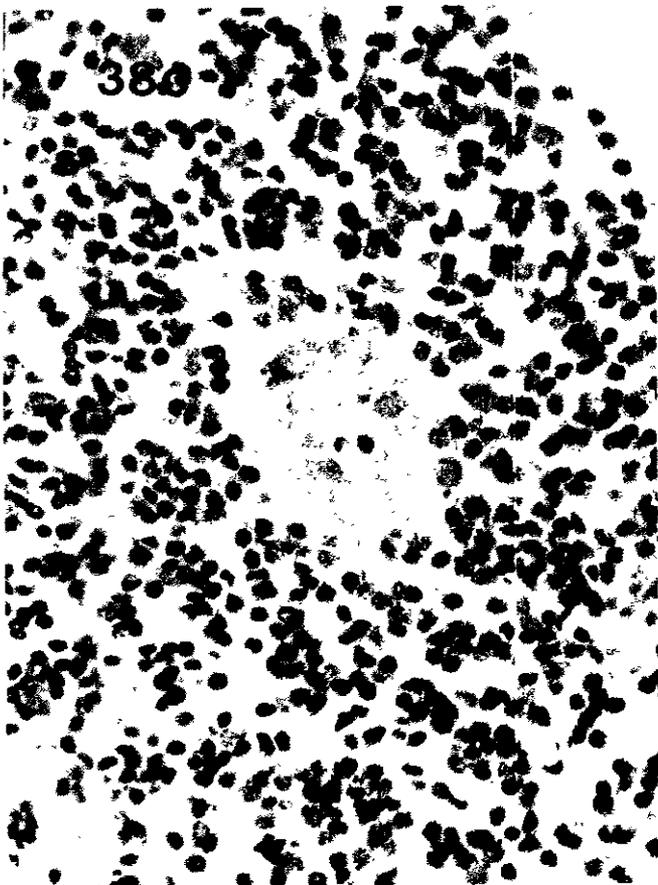
34B

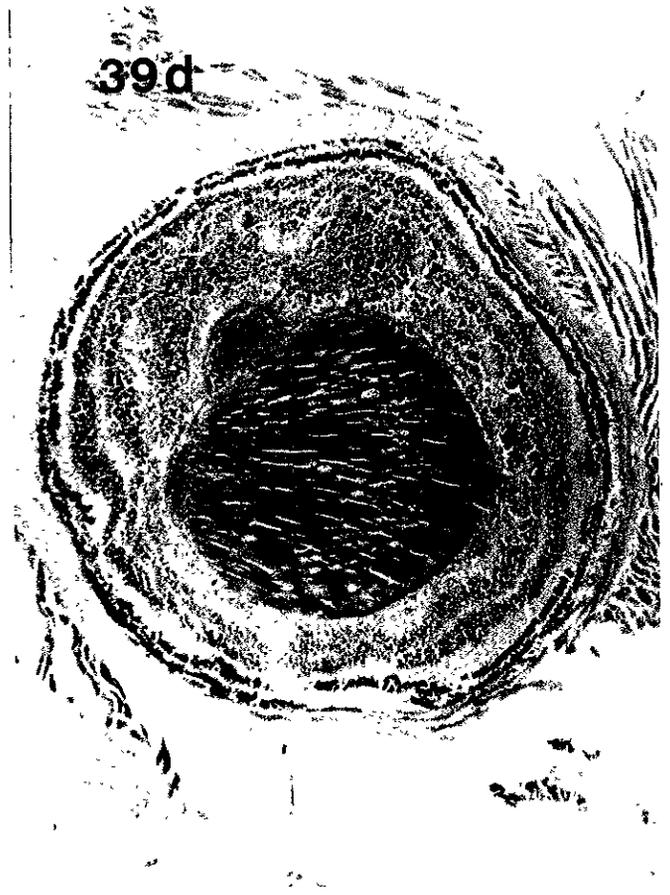












## **Efecto de la infección experimental con larvas de *T. canis* en jerbos sobre la ganancia de peso en el momento del sacrificio.**

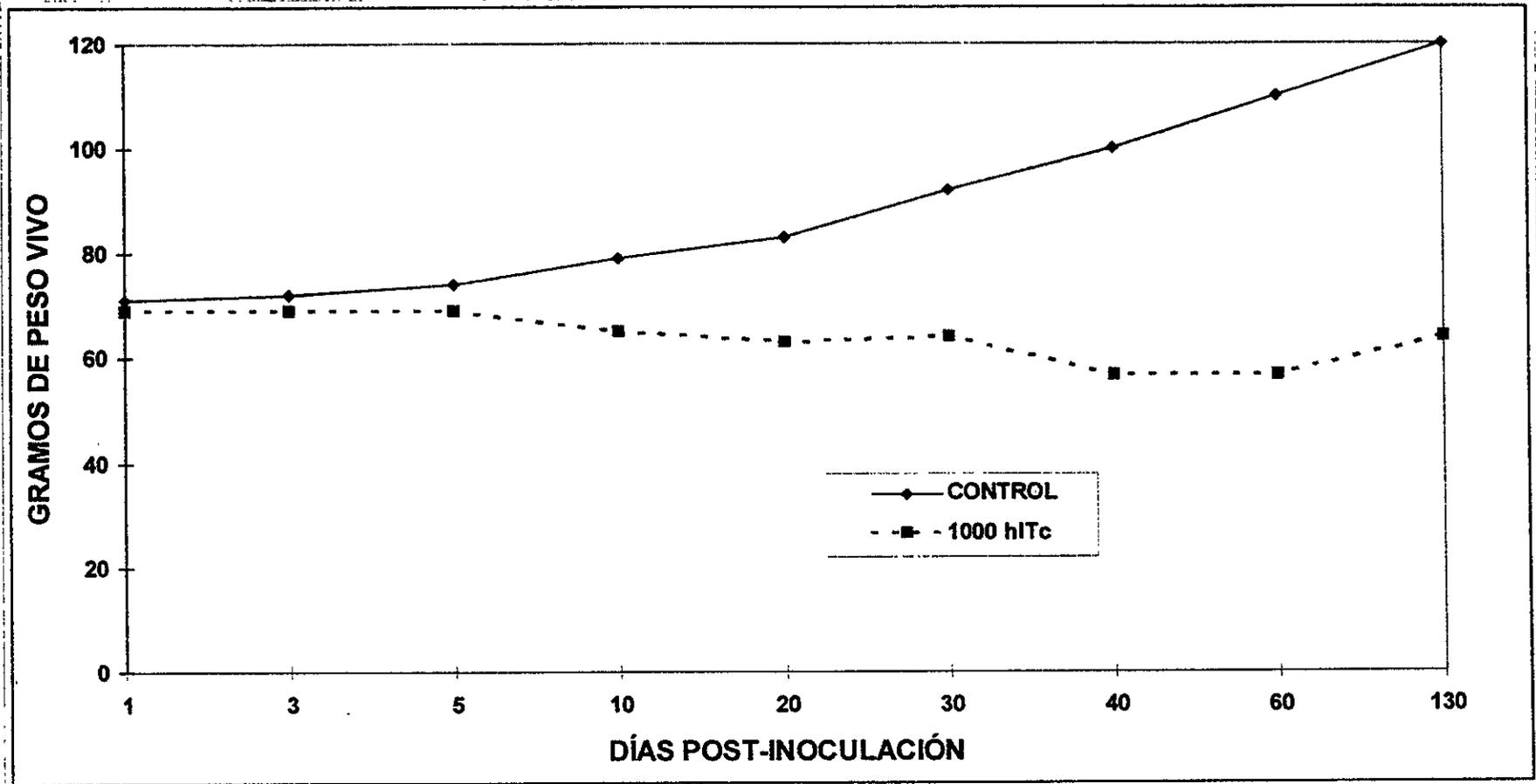
El registro del peso de los animales que se realizó a diferentes periodos de tiempo después de la infección de los animales con hlTc y en el momento del sacrificio de los mismos. Los datos de estas determinaciones se presentan en el cuadro 25 y figura 40. En estos se observa que la ganancia de peso en los animales del grupo testigo (93g) es mayor ( $p < 0.05$ ) a partir del día 30 p.i. comparada con el grupo inoculado con 1000 hlTc. (63g). Esta diferencia ( $p < 0.05$ ) se mantuvo hasta el día 130 p.i. cuando terminó el experimento.

## **Análisis de los síntomas desarrollados en jerbos inoculados con 1000 hlTc**

Los animales a las 12, 24 y 72 horas p.i. no presentaron manifestaciones clínicas. Los días 5 y 10 p.i. los jerbos presentaron alergatamiento, pelo hirsuto y respiración abdominal rápida. El día 20 p.i. los animales presentaron respiración abdominal rápida, retraso del crecimiento, pelo hirsuto, ojos sumidos y ligera incoordinación. El día 30 p.i. los jerbos presentaron incoordinación marcada, ojos sumidos y cristalinos, algunos con edema palpebral, pelo hirsuto y retraso en el crecimiento. Los días 40 y 60 p.i. los jerbos presentaron incoordinación, pelo hirsuto, retraso en el crecimiento y la mayoría con edema palpebral.

<b>DÍAS p.i.</b>	<b>TESTIGO</b>	<b>1000 hITc</b>
<b>1</b>	<b>71.3 +/- 2.53</b>	<b>69.36 +/- 3.45</b>
<b>3</b>	<b>72.3 +/- 6.33</b>	<b>68.98 +/- 7.25</b>
<b>5</b>	<b>74 +/- 2.14</b>	<b>69.1 +/- 6.93</b>
<b>10</b>	<b>79.5 +/- 9.19</b>	<b>65.81 +/- 6.05</b>
<b>20</b>	<b>83.2 +/- 10.32</b>	<b>63.73 +/- 6.41</b>
<b>30</b>	<b>92.6 +/- 3.04</b>	<b>64.91 +/- 2.43</b>
<b>40</b>	<b>100.64 +/- 2.12</b>	<b>57.04 +/- 5.17</b>
<b>60</b>	<b>110.04 +/- 10.07</b>	<b>57.19 +/- 4.6</b>
<b>130</b>	<b>120.28 +/- 3.36</b>	<b>64.67 +/- 9.64</b>

**Cuadro 25.- Efecto de la infección de larvas *T. canis* sobre la ganancia de peso. En este experimento se usaron dos grupos de jerbos, el primero formado por 45 jerbos inoculados con 1000 hITc y el segundo por 45 jerbos no inoculados. A diferentes tiempos después de la infección de los animales se sacrificaron 5 jerbos de cada grupo. Cada dato representa la media y desviación standard del peso en el momento del sacrificio de 5 animales.**



**Figura 40.- Efecto de la infección de larvas *T. canis* sobre la ganancia de peso. En este experimento se usaron dos grupos de jerbos, el primero formado por 45 jerbos inoculados con 1000 hITc y el segundo por 45 no inoculados, se sacrificaron y pesaron 5 jerbos de cada grupo a diferentes períodos de tiempo. Cada punto representa el peso de 5 animales.**

## **Titulación de sueros de conejo antigammaglobulinas de jerbo.**

Los sueros obtenidos de los conejos inmunizados con gammaglobulinas de jerbo fueron titulados por ELISA. Los resultados que se presentan en el cuadro 26 y figura 41 muestran que los sueros de los conejos inmunizados contienen anticuerpos que reconocen las gammaglobulinas de jerbo. Existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los sueros de los conejos inmunizados y el suero de el conejo testigo. No se presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los resultados obtenidos entre las tres diluciones del suero utilizado o entre las tres cantidades de gammaglobulinas pegadas a las placas.

## **Análisis electroforético de las proteínas de secreción excreción de larvas de *T. canis*.**

El patrón electroforético después de la tinción de los geles SDS-PAGE en los que separaron los Ag-SET mostró un total de 7 bandas. Los PM se determinaron empleando marcadores de peso molecular de referencia. Las bandas determinadas correspondieron a: 200, 126, 119, 70, 32, 28 y 24 kDa. de peso molecular. La banda más fuertemente teñida fue la de 32, lo que indica que es la más abundante en el conjunto de los Ag-SET.

## **Cuantificación de anticuerpos séricos contra Ag-EST detectados por ELISA en jerbos inoculados experimentalmente con hITc.**

Los datos de D.O. obtenidos en los ensayos de ELISA empleando suero de jerbos inoculados con hITc y grupos de jerbos testigo, se presenta en la cuadro 27 y figura 42. En estas, se muestra que los títulos de anticuerpos contra Ag-SET en el suero de jerbos inoculados con hITc empiezan a aumentar partir del día 10 p.i.. Entre los días 20 y 130 p.i. se presentaron diferencias ( $p < 0.05$ ) entre el grupo de jerbos inoculados en cualquiera de las diluciones usadas y el grupo de jerbos testigo. Aunque se presentaron diferencias de densidad óptica entre las curvas de anticuerpos de las tres diluciones usadas para el grupo inoculado, las diferencias no fueron significativas ( $p < 0.05$ ).

## **Cuantificación de anticuerpos oculares contra Ag-SET detectados por ELISA en jerbos inoculados experimentalmente con hITc.**

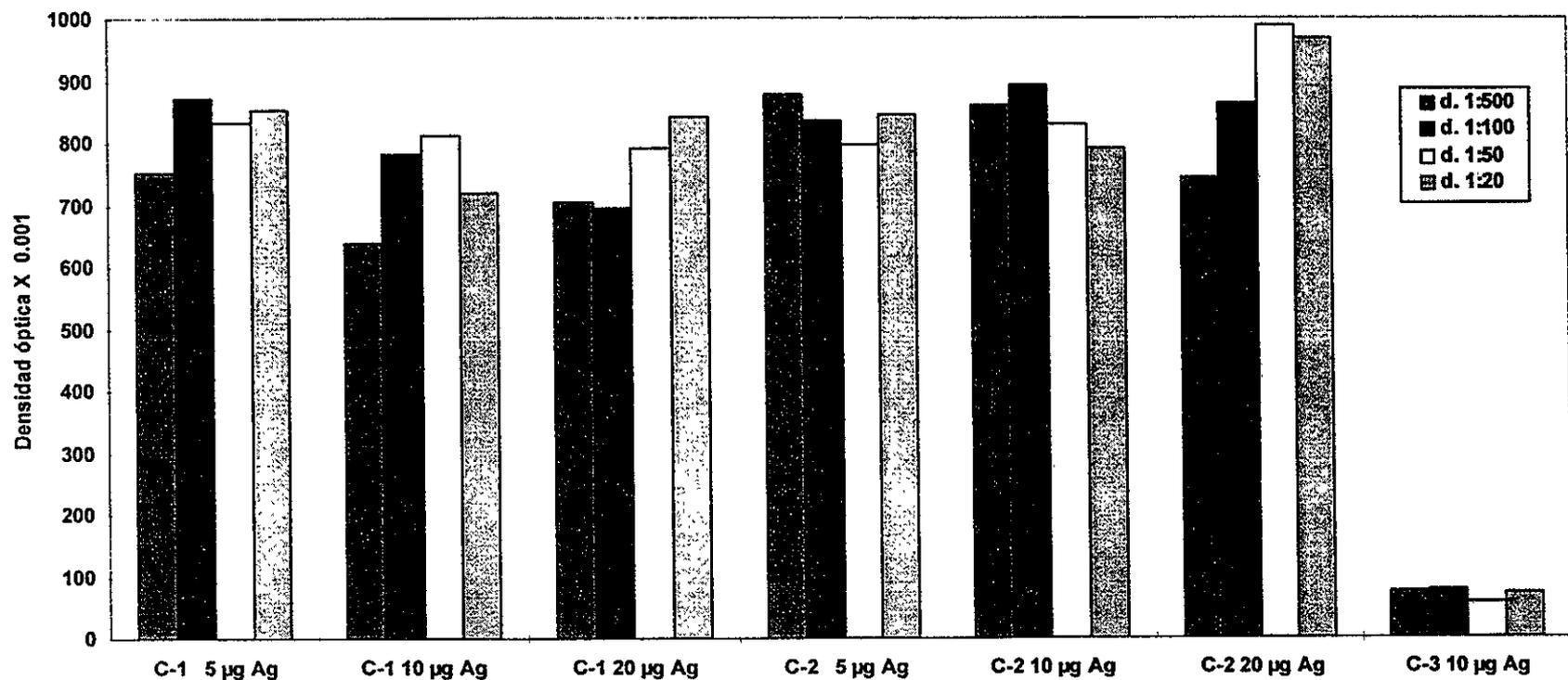
Los datos de D.O. obtenidos en los ensayos de ELISA empleando líquido intraocular de jerbos inoculados con hITc y grupos de jerbos testigo, se presenta en el cuadro 28 y figura 43. En estos, se observa que los títulos de anticuerpos oculares contra Ag-SET en jerbos inoculados con hITc empiezan a aumentar partir del día 30 p.i. , entre los días 40 y 130 p.i. se presentaron diferencias ( $p < 0.05$ ) entre el grupo de jerbos inoculados en cualquiera de las diluciones usadas y el grupo de jerbos testigo. Aunque se presentaron diferencias de densidad óptica entre las curvas de anticuerpos de las dos diluciones usadas para el grupo inoculado, no fueron significativas ( $p < 0.05$ ) en ninguno de los puntos.

## **Determinación de los antígenos de secreción y excreción de larvas de *T. canis* reconocidos por sueros de jerbos inoculados experimentalmente.**

La determinación de los antígenos reconocidos por sueros de jerbos inoculados experimentalmente con hITc se llevó a cabo mediante la técnica de Western blot. El patrón antigénico detectado corresponde al reconocimiento de hasta 8 bandas de Ag-SET. El análisis del reconocimiento antigénico mostró una reactividad gradual de estos antígenos, los sueros de los jerbos sacrificados el día 20 p.i. reconocieron en forma leve una banda de 32 Kds., mientras que los anticuerpos detectados en suero de los animales sacrificados al día 30 reconocieron bandas de 120, 32, 29 y 24 Kds.. Los sueros de los animales sacrificados al día 40 y día 60 p.i. reconocieron Ag-SET de 120, 70, 66, 55, 32, 29 y 24 Kds. y los sueros de los animales sacrificados el día 130 p.i. reconocieron bandas de 200, 120, 70, 66, 55, 32, 29 y 24 Kds. (figura 43).

	d. 1:500	d. 1:100	d. 1:50	d. 1:20
C-1 5 µg Ag	0.752 +/- 0.063	0.873 +/- 0.046	0.832 +/- 0.052	0.855 +/- 0.042
C-1 10 µg Ag	0.640 +/- 0.029	0.783 +/- 0.033	0.812 +/- 0.034	0.718 +/- 0.046
C-1 20 µg Ag	0.704 +/- 0.021	0.695 +/- 0.014	0.791 +/- 0.021	0.843 +/- 0.039
C-2 5 µg Ag	0.879 +/- 0.072	0.836 +/- 0.061	0.798 +/- 0.058	0.846 +/- 0.028
C-2 10 µg Ag	0.859 +/- 0.040	0.893 +/- 0.038	0.829 +/- 0.042	0.792 +/- 0.014
C-2 20 µg Ag	0.743 +/- 0.031	0.866 +/- 0.018	0.987 +/- 0.039	0.968 +/- 0.056
C-3 10 µg Ag	0.076 +/- 0.009	0.078 +/- 0.029	0.056 +/- 0.013	0.076 +/- 0.007

**Cuadro 26.- Titulación de sueros de conejo antigammaglobulinas de jerbo. Se compararon por ELISA las densidades ópticas de diferentes diluciones de suero de dos conejos inmunizados con gammaglobulinas de jerbo (C-1 y C-2) y un Conejo no inmunizado (C-3). Se pegaron a las placas de ELISA 3 diferentes cantidades de gammaglobulinas de jerbo y se reveló la reacción con un conjugado antigammaglobulinas de conejo marcado con fosfatasa alcalina. Cada dato representa media y desviación standard de seis repeticiones.**



**Figura 41.- Titulación de sueros de conejo antigammaglobulinas de jerbo. Se compararon por ELISA las densidades ópticas de diferentes diluciones de los suero de dos conejos inmunizados con gammaglobulinas de jerbo (C-1 y C-2) y un Conejo no inmunizado (C-3). Se pegaron a las placas de ELISA 3 diferentes cantidades de gammaglobulinas de jerbo y la reacción se reveló con un conjugado antigammaglobulinas de conejo marcado con fosfatasa alcalina. Cada columna representa la media de seis repeticiones.**

<b>DIAS p.i.</b>	<b>d. 1:500</b>	<b>d. 1:1000</b>	<b>d. 1:2000</b>	<b>NEG. 1:500</b>
<b>5</b>	<b>0.013 +/- 0.009</b>	<b>0.043 +/- 0.016</b>	<b>0.019 +/- 0.009</b>	<b>0.029 + 0.002</b>
<b>10</b>	<b>0.314 +/- 0.071</b>	<b>0.229 +/- 0.030</b>	<b>0.184 +/- 0.027</b>	<b>0.062 +/- 0.017</b>
<b>20</b>	<b>0.873 +/- 0.112</b>	<b>0.784 +/- 0.087</b>	<b>0.528 +/- 0.073</b>	<b>0.034 +/- 0.013</b>
<b>30</b>	<b>0.976 +/- 0.191</b>	<b>0.863 +/- 0.119</b>	<b>0.625 +/- 0.101</b>	<b>0.026 +/- 0.004</b>
<b>40</b>	<b>1.096 +/- 0.170</b>	<b>0.906 +/- 0.208</b>	<b>0.732 +/- 0.322</b>	<b>0.038 +/- 0.014</b>
<b>60</b>	<b>1.013 +/- 0.128</b>	<b>0.943 +/- 0.102</b>	<b>0.730 +/- 0.226</b>	<b>0.042 +/- 0.026</b>
<b>130</b>	<b>1.213 +/- 0.088</b>	<b>0.895 +/- 0.110</b>	<b>0.699 +/- 0.111</b>	<b>0.038 +/- 0.019</b>

**Cuadro 27.- Valores de D.O. detectada por ELISA empleando antígenos de secreciones y excreciones de larvas de *T. canis* y sueros de jerbos infectados con el parásito. El ensayo de ELISA se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en material y métodos. En estos se usaron siete grupos de 5 jerbos cada uno, inoculados con 1000 huevos larvados de *T. canis* y sacrificados a diferentes períodos p.i., en la columna 2, 3 y 4 se presentan los resultados de usar diferentes diluciones de los sueros. En la columna 5 se presentan los resultados de sueros de 7 grupos de 5 jerbos no inoculados y sacrificados a mismo tiempo que los grupos inoculados. Cada suero se probó por triplicado.**

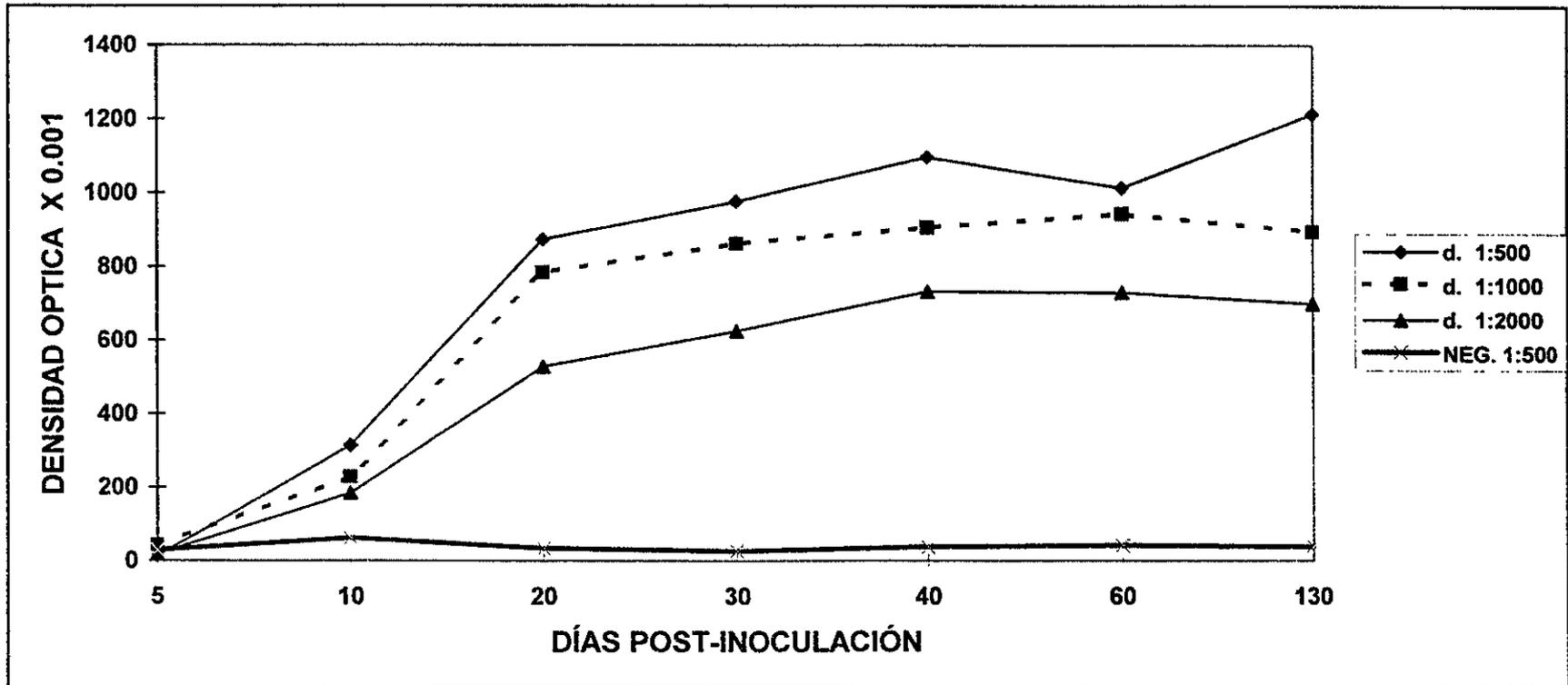


Figura 42.- Cinética de la producción de anticuerpos circulantes detectados por ELISA contra antígenos de secreciones y excreciones de larvas de *T. canis* en jerbos inoculados experimentalmente con el parásito. El ensayo de ELISA se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en material y métodos se usaron siete grupos de 5 jerbos cada uno, inoculados con 1000 huevos larvados de *T. canis* y sacrificados a diferentes períodos p.i., en la curvas 1, 2 y 3 se presentan los resultados de usar diferentes diluciones de los sueros. En la curva 4 se presentan los resultados de sueros de 7 grupos de 5 jerbos no inoculados y sacrificados a mismo tiempo que los grupos inoculados. Cada suero se probó por triplicado.

	d. 1:20	d. 50	neg. 1:20
5	0.024 +/- 0.007	0.028 +/- 0.006	0.037 +/- 0.007
10	0.032 +/- 0.011	0.034 +/- 0.009	0.039 +/- 0.005
20	0.046 +/- 0.012	0.035 +/- 0.015	0.029 +/- 0.014
30	0.136 +/- 0.028	0.104 +/- 0.017	0.036 +/- 0.016
40	0.152 +/- 0.034	0.129 +/- 0.023	0.021 +/- 0.007
60	0.219 +/- 0.032	0.185 +/- 0.019	0.027 +/- 0.009
130	0.207 +/- 0.029	0.176 +/- 0.025	0.036 +/- 0.013

**Cuadro 28.- Valores de D.O. detectada por ELISA empleando antígenos de secreciones y excreciones de larvas de *T. canis* en liquido intraocular de jerbos infectados con el parásito. El ensayo de ELISA se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en material y métodos. En estos se usaron siete grupos de 5 jerbos cada uno, inoculados con 1000 huevos larvados de *T. canis* y sacrificados a diferentes períodos p.i., en la columna 2 y 3 se presentan los resultados de usar diferentes diluciones de liquido intraocular. En la columna 4 se presentan los resultados de 7 grupos de 5 jerbos no inoculados y sacrificados a mismo tiempo que los grupos inoculados. Cada suero se probo por triplicado.**

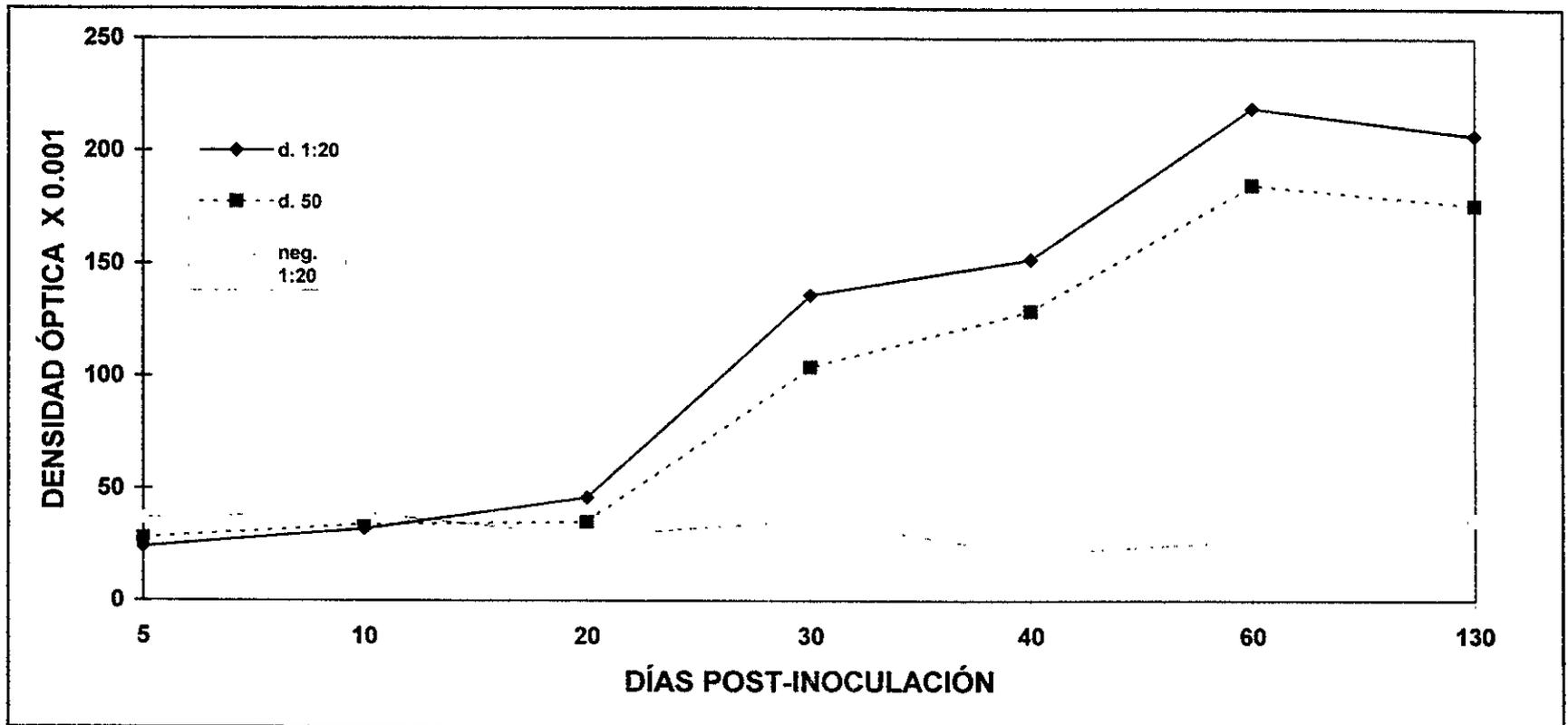


Figura 43.- Cinética de la producción de anticuerpos oculares detectados en ELISA contra antígenos de secreciones y excreciones de larvas de *T. canis* en jervos. En los ensayos de ELISA para determinar Anticuerpos en líquido intraocular se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en material y métodos. En estos se usó líquido intraocular de siete grupos de 5 jervos cada uno, inoculados con 1000 huevos larvados de *T. canis* y sacrificados a diferentes períodos p.i., en las curvas 1 y 2 se presentan los resultados de usar diferentes diluciones. En la curva 3 se presentan los resultados de sueros de 7 grupos de 5 jervos no inoculados y sacrificados a mismo tiempo que los grupos inoculados. Cada suero se probó por triplicado.

# DISCUSIÓN

Algunas de las primeras preguntas a resolver cuando se propone el uso de un nuevo modelo experimental en infecciones por helmintos son: cuál es la dosis de infección, donde está el parásito y cómo llega a este lugar. Por lo anterior, las primeras preguntas que se intentaron resolver en este trabajo fueron: cuál es el efecto de la inoculación de diferentes dosis infectantes de *T. canis* en los jerbos, por donde migran las larvas de *T. canis* y cuales son lugares donde se localizan y acumulan estas larvas.

Las digestiones con jugo gástrico artificial han sido utilizadas desde hace tiempo por diferentes autores para determinar donde se encuentran larvas de *T. canis* en hospederos paraténicos (Oshima, 1961; Kayes & Oaks, 1976; Abo-Shehada et al., 1984). Estos autores han demostrado que la utilización de las digestiones artificiales y conteo posterior de larvas, es una forma adecuada de evaluar cuantas larvas se encuentran en un determinado órgano en un momento dado.

Nuestro grupo ha demostrado con anterioridad que los jerbos pueden actuar como hospederos paraténicos de *T. canis*. En esos trabajos iniciales no se realizaron estudios longitudinales de migración o la evaluación del efecto de diferentes dosis de inóculo en la infección de estos animales (Alba y col, 1994; Flores-Alatorre, 1993). En el trabajo realizado en esta tesis se escogieron las dosis de inóculo de acuerdo a las utilizadas para otros hospederos paraténicos y buscando una dosis baja, una media y otra alta del mismo. En estudios reportados por Havasiová-Reiterová y cols. en 1995 demostraron que la inoculación de 5 huevos larvados de *T. canis* induce la producción de anticuerpos específicos en ratones, pero varios autores han mostrado que la dosis mínima adecuada para observar la migración de larvas en ratones es de 200 hlTc ( Lee, 1960; Kayes & Oaks, 1976), por lo que fue la dosis más pequeña utilizada en este estudio. Lee (1960) informó que la dosis letal 50 % para ratones es de 2000 hlTc (aproximadamente 100 por g de peso vivo), por lo que se decidió utilizar la mitad como dosis media en este trabajo, esta dosis es utilizada por otros investigadores para inducir infecciones severas en ratones (Bardon et al., 1995; Keyes & Oaks, 1976; Zyngier & Brockbank, 1974). Al ser los jerbos animales de mayor tamaño (70-80 g al inicio del trabajo), se decidió utilizar una dosis de 5000 hlTc que

es mayor a la dosis letal 50 % de ratones y poder evaluar de esta manera como migran las larvas en una infestación masiva.

Se recuperaron larvas en diferentes órganos de todos los animales inoculados, independientemente de la dosis utilizada. La cantidad de larvas recuperadas estuvo en relación directa con el número de larvas inoculadas, a mayor cantidad de larvas inoculadas mayor fue el número de larvas recuperadas en los diferentes órganos. El porcentaje máximo de larvas recuperadas en relación al número de hITc inoculados, varió de acuerdo a la dosis de inoculación, para los animales del grupo inoculado con 200 hITc fue del 42% el día 5 p.i., para los del grupo inoculado con 1000 hITc fue del 74 % el día 40 p.i. y del 58% el día 30 p.i. para el grupo inoculado con 5000 hITc (Cuadros 4, 6 y 8). Los porcentajes de recuperación de larvas en los jerbos son mayores que los reportados en ratones por otros autores que varia del 20 al 42 % (Abo-Shehada & Herbert, 1984; Bardón et al., 1995; Havasiová-Reiterová et al., 1995; Kayes & Oaks, 1976; Oshima, 1960). Los jerbos de entre 80 y 100 g de peso comen aproximadamente la mitad de alimento que los ratones de 20-30 g. de peso (observación personal), lo cual sugiere que los jerbos tienen movimientos intestinales más lentos que los ratones, lo que probablemente hace que los huevos permanezcan más tiempo en el intestino y un mayor número de huevos eclosionen y puedan atravesar la pared intestinal. El proceso de recuperación de las larvas es grosero y algunas larvas se pueden perder en el proceso y ser otra razón por la que el número de larvas recuperadas es menor al número inoculado.

La migración larvaria empieza en la pared intestinal, en este lugar se recuperó el mayor número de larvas entre las 12 y 24 horas p.i. en todos los grupos, no se recuperaron larvas ni se encontraron alteraciones patológicas en esófago o estómago, por lo que se deduce que las larvas penetran a través del intestino. No existe una parte del intestino por la que específicamente atraviesen estas larvas, puesto que se encontraron lesiones hemorrágicas en varias partes del intestino y los estudios u observaciones histopatológicas mostraron larvas en serosa tanto de intestino delgado como de intestino grueso. La cantidad de larvas en el intestino disminuyó al tercer día y no se encontraron larvas del día 5 en adelante. Las lesiones microscópicas en intestino solo se presentaron del día 1 al 5. Estas se caracterizaron por la presencia de larvas en las tunicas muscular y serosa con fuerte

reacción inflamatoria caracterizada por infiltrado de neutrófilos, linfocitos y eosinófilos. Sin embargo, pese a esta fuerte reacción celular como se muestra en la figura 13d, las larvas aparentemente estaban sin ningún daño. Es probable que no todas las larvas detengan o sean atrapadas momentáneamente en su migración y provoquen dicha reacción, puesto que se detectaron algunas larvas en pulmones o hígado incluso a las 12 horas p.i..

En todos los grupos, el número total de larvas recuperadas el día 1 p.i. es menor en comparación con los otros muestreos, esto probablemente se deba a que las larvas están migrando de intestino a otros lugares por la sangre. Los animales en el momento del sacrificio se les extrajo toda la sangre posible para las pruebas de biometría hemática y quizá esta sangre llevaba las larvas que no se recuperaron en los tejidos digeridos.

Entre los días 3 y 5 p.i. conforme desaparecían las larvas en intestino, aumentaba la cantidad de larvas recuperadas en pulmones e hígado lo que indica que las larvas migraron preferentemente a estos lugares. Si embargo, la mayor tasa de dispersión de las larvas en los órganos se encontró el día 5 p.i. en donde se detectaron larvas en la mayoría de los órganos muestreados como si algunas larvas estuvieran buscando el lugar adecuado para sobrevivir. Del día 10 al 60 ocurre una redistribución de larvas en el organismo, la tendencia de las larvas es a migrar a cerebro y carcaza en los jerbos inoculados o ser gradualmente atrapados en estos órganos.

Con el objeto de analizar la preferencia que tenían las larvas para migrar a un órgano determinado se evaluó la concentración de larvas por gramo de órgano. Para esto, en el momento del sacrificio se pesaron todos los órganos, posteriormente se dividió la cantidad de larvas entre el número de gramos y de esta manera se obtuvo la concentración de larvas en un órgano determinado. De esta manera se observó la preferencia de migración de las larvas en los tres grupos hacia el hígado, riñones y pulmones entre el día 1 y 10 p.i., posteriormente entre el día 20 y 60 p.i. existe una mayor tendencia de las larvas por cerebro que por cualquier otro órgano. Aunque la cantidad de larvas es mayor en la carcaza, su concentración de larvas es mucho menor que en cerebro, incluso la concentración de larvas en la carcaza es menor que la concentración de larvas en corazón y riñones. La tendencia a acumular larvas en cerebro también ha sido observada en otros modelos experimentales como los ratones (Dunsmore et al., 1983). Probablemente esta acumulación es un

mecanismo por medio del cual las larvas evaden la respuesta del huésped, puesto que en cerebro es muy difícil que se monte una respuesta inflamatoria aguda.

La cantidad y concentración de larvas en los diferentes tejidos tiende a ser estable entre los días 20 y 60 p.i.(cuadros 5, 7 y 9). La mayoría de las larvas en estos días detienen su migración, sin embargo, algunas permanecen en constante movimiento, esto se demuestra por la presencia de lesiones agudas los días 40 y 60 p.i. en hígado, pulmones y riñones (Fig. 15d).

A la fecha no se han descrito estructuras especializadas en las larvas que le permitan atravesar en forma mecánica la pared intestinal, por lo que se ha propuesto que algunas enzimas proteolíticas producidas por larvas de *T. canis* que tienen actividad *in vitro* sobre membranas y matrices extracelulares, podrían *in vivo* ser un importante mecanismo, no sólo para atravesar pared intestinal sino también para facilitar la migración de estas larvas por tejidos de otros órganos (Robertson et al., 1989).

La migración de las larvas de *T. canis* a los diferentes órganos de los jerbos inoculados se realiza de varias maneras. La primera de estas formas puede ser por vía sanguínea, puesto se encontraron larvas en la luz de vasos sanguíneos (fig. 22B) y en capilares de la coroides (fig. 43A y 43B), además, algunas larvas tardan sólo 12 horas de llegar desde el intestino hasta pulmón e hígado (cuadro 6), esta forma tan rápida de migrar sólo puede ocurrir si viajan por sangre o sistema linfático, la presencia de larvas en corazón los día 3 y 5 p.i. también sugiere esta vía. Una segunda vía de migración puede ser por pared de vasos sanguíneos, varios hallazgos histopatológicos como la continua presencia de lesiones alrededor de vasos sanguíneos (fig. 19D, 20A, 21B y 29 D) y la presencia de larvas en el espacio de Virchow-Robin (fig. 28B) apoyan esta afirmación. La tercera forma de migración, puede ser por continuidad anatómica de un órganos a otro, los hallazgos histopatológicos que sugieren esta vía son: lesiones con infiltrado celular en forma de cordón que parecen ir de un vaso sanguíneo a la superficie del órgano (25A y 25C), en esta se observan depresiones y tejido de cicatrización (15C, 21A, 21C y 25C). La presencia de pequeños abscesos con larvas dentro, en peritoneo o sobre la superficie de hígado, riñones y pulmón, solo se puede explicar por la migración de larvas a través del tejido y migración por continuidad anatómica.

La evolución de las lesiones en hígado, pulmones y riñones guarda muchas similitudes, los primeros días p.i. (1, 3 y 5 días) son lesiones de tipo agudo con larvas e infiltrado de neutrófilos y eosinófilos. Posteriormente, empieza a disminuir las larvas en los órganos y las lesiones tienden a la cronicidad con infiltrados de linfocitos, macrófagos y presencia de fibrocitos y colágena. Se observaron algunas lesiones de tipo agudo (con infiltrado de neutrófilos y eosinófilos) entre los días 30 y 60 p.i., probablemente se deben a la migración de algunas larvas por estos lugares hasta el final del experimento.

La mayoría de las lesiones de tipo crónico observadas en hígado, pulmones y riñones, presentaron, independientemente de que hubiera una larva o no dentro de la lesión, la presencia de algunos neutrófilos, eosinófilos y macrófagos en el centro y rodeando a éstos, una capa de fibrocitos y colágena (Fig. 15D, 20D, 24B y 24C). Probablemente las larvas de *T. canis* dejan algunos antígenos en este lugar y éstos estimulan la permanencia de células de inflamación aguda en una lesión crónica, se han observado este tipo de lesiones cuando hay un irritante potente o un antígeno resistente a la degradación (Robbins, 1975).

Sólo se presentaron lesiones o larvas en corteza renal y nunca en médula renal, quizás como consecuencia del mecanismo de entrada de las larvas o de distribución vascular del riñón. La distribución de estas lesiones en riñón, probablemente se deban a que una de las vías de migración de larvas de *T. canis* en los jerbos es la sanguínea, y como la irrigación sanguínea principalmente llega por medula renal esto podría explicar esta distribución. Otras explicaciones podrían ser que las condiciones del tejido medular no son favorables a las larvas, ya que entre otras cosas a nivel medular hay más concentración de sodio a nivel cortical (Cogan, 1993).

La acumulación de larvas en el cerebro, como ya se mencionó antes probablemente es una forma en que las larvas evaden la respuesta inmune de su hospedero, puesto que la inflamación aguda rara vez se presenta en este lugar. La respuesta que se monta contra las larvas de *T. canis* en los jerbos, entre los días 10 y 20 p.i. es ligera, pero aumenta de intensidad entre los días 30 y 60 p.i. sobre todo alrededor de los vasos sanguíneos (figuras 27C y 27D). El día 40 p.i. presentaron pequeñas zonas de degeneración (figura 29A) y algunas larvas sin ningún tipo de respuesta alrededor. El día 60 p.i. se observaron larvas en zonas de degeneración con depósitos de calcio (figura 30C), algunos otros no presentaron

los depósitos de calcio (figura 30B) y algunas larvas que aparentemente no tenían ni respuesta inflamatoria ni producían degeneración (figura 29D). La aparición de zonas de degeneración en cerebro a partir del día 40 correlacionó con la aparición de manifestaciones nerviosas en los jerbos, principalmente incoordinación. Los reportes de larvas en cerebros humanos son múltiples, se ha discutido por varios autores el daño producido por larvas de *T. canis* en el sistema nervioso central de humanos, mientras algunos han reportado diferentes problemas como: encefalitis, encefalopatías, ataxia y disturbios neurológicos (Hill, 1985; Moore, 1962; Schochet, 1967; Sommer et al., 1994; Lowichik & Ruff, 1995) otros no han encontrado ningún tipo de relación entre infección y patología nerviosa (Magnaval et al., 1997). Además, se ha asociado la seropositividad a *T. canis* al bajo desarrollo de la inteligencia en niños ( Nelson et al., 1996) y a una menor calificación en pruebas de funcionamiento motor y cognoscitivo al de niños seronegativos (Shofer et al, 1985).

En las digestiones artificiales de los ojos de los jerbos sacrificados a partir del día 5 p.i. se detectaron pequeñas cantidades de larvas. Las larvas de *T. canis* llegaron al ojo de los jerbos presumiblemente por vía sanguínea, puesto que se detectaron larvas en vasos coroidales el día 10 p.i.. Las lesiones observadas en ojos de los jerbos inoculados fueron parecidas a las lesiones reportadas en humanos con larva migrans ocular. Entre las lesiones reportadas en humanos y las observadas en los jerbos se encuentran la tendencia a formar granulomas en retina y en procesos ciliares (fig. 38b y 39b), infiltración de células inflamatorias en humor vitrio (fig. 37b y 39c), hemorragias retinales (fig. 35B y 37c), desprendimiento de retina (36C), destrucción de retina (37d), hemorragias en procesos ciliares (37C y 37D) y retinitis (36B) ( Desai et al., 1996; Gass & Braunstein, 1983; Glickman, 1987; Glickman and shoffer, 1987; Margo et al., 1986; Mihara et al., 1993; Schantz et al., 1979; Smith and Greer, 1971; Sorr, 1984; Zygulska et al., 1993).

Cuando se analizó la ganancia de peso de los jerbos inoculados con 1000 hITc se observó que esta era estadísticamente menor ( $p < 0.05$ ) a partir del día 30 p.i. que la observada en el grupo control. Esta diferencia se mantuvo hasta el día 130 p.i. cuando terminó el experimento. Las razones por las que el grupo inoculado tuvo una menor ganancia de peso, probablemente fueron el efecto de las larvas en el sistema nervioso y en

los ojos, puesto que en estos animales empezaron los primeros signos de incoordinación entre los días 30 y 40 p.i.. Entre los días 60 y 130 p.i. los jerbos manifestaron evidentes signos de incoordinación y en algunos ceguera, por lo que se les dificultaba llegar al alimento, lo que disminuyó su consumo y por lo tanto la ganancia de peso. Además, es muy probable que los desordenes metabólicos secundarios producidos por el daño en órganos como hígado, riñones y pulmones también contribuya a esta disminución de la ganancia de peso.

Los jerbos inoculados con hITc mostraron cambios hematológicos importantes, la mayoría de los animales presentaron leucocitosis entre los días 5 y 20 p.i.. Se ha reportado que esta leucocitosis también se presenta en humanos con síndrome *larva migrans* (Glickman et al., 1979; Glickman & Shofer, 1987) y en otros modelos experimentales de toxocariasis (Aljeboori & Ivey, 1970; Glickman & Summers, 1983; Parsons et al., 1989; Tonimura et al., 1976). Se conoce poco sobre la causa de esta leucocitosis, pero probablemente se deba a que antígenos de *T. canis* inducen leucopoyesis, puesto que se sabe que diferentes antígenos de *T. canis* tienen actividad mitogénica sobre linfocitos (Wang et al., 1995) o que la aplicación de anticuerpos antiCD4 reduce la leucocitosis y la eosinofilia en ratones (Kusama et al., 1995). Las células CD4+ Th2 producen un panel de citocinas que incluyen principalmente IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-12 (Mosmann & Coffman, 1989), estas citocinas inducen sobre tejido linfoide proliferación celular lo que probablemente es la causa de la leucocitosis, un hecho que apoya esta hipótesis es que se ha demostrado en infecciones por *T. canis* en ratones un aumento la producción de IL-5 (Yamaguchi et al., 1990), por lo que probablemente aumenta también la producción de las otras interleucinas. Además, es importante mencionar que durante la inflamación aguda el tejido necrótico produce un factor inespecífico que induce la leucocitosis (Sell, 1996), entre los día 3 y 10 p.i. hay grandes zonas con inflamación aguda y zonas con necrosis en hígado, pulmones y riñones de los jerbos inoculados (figuras 15A, 18A, 22D y 17D) y esto podría ser otra causa de la leucocitosis. El aumento de tejido linfoide asociado a bronquios (figura 16A) y el aumento de actividad celular, así como del tamaño del bazo (Figura 13c) observado en los jerbos inoculados con hITc confirman la existencia de la leucopoyesis.

La linfocitosis, neutrofilia y monocitosis observada en los jerbos inoculados con hITc parece deberse a una leucocitosis indiscriminada, puesto que no aumentó la cantidad relativa de linfocitos, neutrófilos o monocitos (porcentaje) dentro de los leucocitos, pero al aumentar la cantidad de leucocitos aumento la cantidad de células que forman este grupo. Así, las causas que provocaron estos aumentos de células, probablemente sean las mismas de la leucocitosis.

El conteo de eosinófilos en sangre demostró que en este modelo animal, la inoculación con hITc produce un aumento en la cantidad relativa de eosinófilos sanguíneos, este aumento no estuvo relacionado a la leucocitosis observada, puesto que se presentó en diferentes periodos p.i.. La curva de eosinófilos en los jerbos presentó un pico el día 5 y otro el día 40 p.i.. Resultados similares a los anteriores han sido reportados en ratones, aunque los picos se presentaron en éstos los días 10 y 28 p.i. (Sugane et al., 1982). El origen de esta eosinofilia ha generado gran interés y controversia, se ha demostrado que la eosinofilia producida en ratones infectados experimentalmente con otros helmintos como *Ascaris suum*, *Schistosoma mansoni* y *Trichinella spiralis* es dependiente de linfocitos T (Nielsen et al., 1974; Phillips et al., 1977; Ruitenbergh et al., 1977). Sugane et al. en 1982 encontraron que la eosinofilia periférica en ratones BALB/c-nu/+ (nu/+) infectados experimentalmente con larvas de *T. canis* presenta dos picos en los días 10 y 20 p.i. y que se presenta sólo el primer pico en ratones atímicos BALB/c-nu/nú (nu/nú) infectados, lo anterior sugiere que la eosinofilia producida por *T. canis* puede ser T-dependiente o T-independiente. Estudios posteriores, demostraron la importancia que tiene la IL-5 en la aparición de eosinofilia en otras infecciones por helmintos y que la aplicación de anticuerpos anti-IL-5 suprime totalmente esta eosinofilia (Limaye et al., 1990; Coffman et al., 1989). Parsons et al. en 1993 bloquearon totalmente la eosinofilia al tratar con anticuerpos monoclonales anti-IL-5 ratones C57BL/6J infectados con larvas de *T. canis*, esto no aclaró el asunto, pues la IL-5 es producida por células Th2 que son muy raras en ratones atímicos (Kennedy et al., 1992). Posteriormente se demostró que en pulmón las células T CD4 y CD8 negativas (doble negativas) tanto de ratones normales como de ratones atímicos infectados con larvas de *T. canis* producían IL-5 y que la eosinofilia en los dos modelos se puede suprimir con la aplicación de anticuerpos monoclonales anti-IL-5

(Kusama et al., 1995; Takamoto & Sugane, 1993; Takamoto et al., 1995). Además, ratones genéticamente deficientes de IL-5 no desarrollan eosinofilia después de la infección experimental con hITc (Takamoto et al., 1997).

La leucocitosis se presentó en los tres grupos de jerbos independientemente de la dosis de hITc inoculados. En contraste, la eosinofilia sólo se presentó en los jerbos inoculados con 1000 y 5000 hITc.

El papel que juegan los leucocitos y en especial los eosinófilos en la defensa de las infecciones por helmintos, ha generado gran controversia, ya que algunos resultados *in vitro* indican que estas células pueden tener efecto tóxico sobre algunos parásitos, este mismo efecto no se ha podido observar en vivo (Abbas et al., 1993; Mahmoud, 1989). En el caso de *T. canis*, se ha reportado que la incubación "in vitro" de larvas con poblaciones celulares enriquecidas de eosinófilos y suero hiperinmune, provoca la fijación a la cutícula de la larva y la degranulación de los eosinófilos, pero esto no afecta ni la movilidad ni la viabilidad de las larvas (Fattah et al., 1986), resulta interesante señalar que no se ha podido demostrar que esta degranulación sea dependiente de IgE (Jones et al., 1994). Por otro lado, se ha demostrado "in vitro" que el mismo efecto se produce cuando se incuban larvas de *T. canis* con neutrófilos (Lombardi et al., 1990).

Los cortes histopatológicos en jerbos demostraron que el infiltrado de eosinófilos y neutrófilos en los tejidos no afecta a las larvas (figuras 13d, 18D y 22D), solo se pudo observar una larva dañada el día 20 p.i. (figura 19A) y no se puede afirmar que sea el efecto de los infiltrados celulares a su alrededor, puesto que había larvas aparentemente intactas en otras partes del hígado, riñones y pulmones del mismo animal. Se ha sugerido que los infiltrados celulares modifican las rutas de migración larvaria pues la ruta de migración cambia en ratones que han sufrido una infestación previa (Parsons & Grieve, 1990a, 1990b).

Los resultados hematológicos encontrados en este modelo experimental son similares a los reportados en los ratones pero diferentes a los encontrados en humanos donde la leucocitosis y la eosinofilia persiste por más de un año. Las razones de esta diferencia no se han estudiado, pero podrían ser una interesante línea de investigación en el futuro.

Durante algún tiempo se utilizaron antígenos solubles de adultos de *T. canis* o de la ruptura de huevos larvados para el inmunodiagnóstico de la toxocariasis (Annen et al., 1975; Cypess et al., 1977; Enayat & Pezeshki, 1977; Smith et al., 1982; Viens et al., 1975). En 1975 DeSavigny demostró que larvas 2 de *T. canis* cultivadas por largos períodos en medios nutritivos libres de suero, producían antígenos de secreciones y excreciones, posteriormente se demostró que estos antígenos tienen una especificidad mayor que los antígenos totales (Badley, et al., 1987; Magnaval et al., 1991; Speiser & Weiss, 1979 ; Sugane & Ohima, 1983).

En los Ag-SET obtenidos en este trabajo que se corrieron en geles de SDS-poliacrilamida, se identificaron un total de 7 bandas de manera constante en cada corrimiento. Las bandas determinadas correspondieron a los pesos moleculares de 200, 155, 139, 70, 32, 28 y 24 kDa. . La banda más fuertemente teñida fue la de 32, lo que indica que es la más abundante en el conjunto de los Ag-SET. Algunos autores han reportado que los antígenos más abundantes que ellos detectaron tiene un PM de 32, 70, 120 y 400 kDa. ( Maizels et al., 1984; Meghji & Maizels, 1986; Sugane & Ohima, 1983). Se ha reportado un conjunto de tres bandas que migran muy cerradamente (165, 149 y 95 kDa.) y son reconocidas por un sólo anticuerpo monoclonal, por lo que se han designado como un sólo complejo de 120 kDa (Maizels et al., 1987, Page et al., 1992a; Page et. al, 1992b). Probablemente, las bandas de 155 y 139 kDa. encontradas en este trabajo correspondan al complejo de 120 kDa. ya reportado.

En este trabajo no se detectó la banda de 400 kDa que es una banda formada por una pequeña cadena peptídica y una gran cantidad de carbohidratos, esta banda no se tiñe con nitrato de plata. La forma en la que se ha detectado la abundancia de esta banda es marcando con Iodo las proteínas de superficie de larvas en cultivo y después buscando estas proteínas en los Ag-SET (Maizels et al., 1984) o tiñendo los geles con una tinción de ácido periodico de Schiiff (PAS) que es específica para carbohidratos (Meghji & Maizels, 1986).

El análisis y la caracterización de los Ag-SET obtenidos en cultivo siempre ha tenido variaciones y discrepancias entre distintos autores en cuanto a su número de componentes y P.M., esto puede deberse en gran parte a detalles diferenciales entre la metodologías empleadas. Sin embargo se han reportado diferencias entre dos lotes de Ag-

SET obtenidos y analizados bajo el mismo protocolo en dos laboratorios distintos. La variación de los Ag-SET obtenidos en diferentes lugares no tiene una base biológica definida, aunque aparentemente no afecta la sensibilidad de las pruebas diagnósticas si constituye una desventaja para el estudio aislado de cada antígeno (Badley et al., 1987).

Para el diagnóstico de toxocariasis tanto en modelos experimentales como humanos se han utilizado varias técnicas inmunológicas como doble difusión radial (Cypess et al., 1977), intradermoreacciones (Collins & Ivey, 1975), precipitación en tubo capilar (Dafalla, 1975), inmunofluorescencia (Annen et al., 1975; Viens et al., 1975; Smith et al., 1982), contrainmunolectroforesis (Enayat & Pezeshki, 1977) y hemaglutinación (Krupp, 1975; DeSavigny & Tizard, 1977). En la actualidad las dos técnicas inmunológicas que se ha demostrado que tienen una mayor sensibilidad y especificidad son ELISA y Western Blot (Glickman et al., 1978; DeSavigny et al., 1979; Speiser & Gottstein, 1984; Jacquier et al., 1991; Magnaval et al., 1991), por lo anterior, estas técnicas se utilizaron en este trabajo.

La producción de anticuerpos en suero contra Ag-SET en los jerbos empieza a los 10 días p.i. y entre los días 20 y 130 p.i. se presentaron diferencias ( $p < 0.05$ ) entre el grupo de jerbos inoculados en cualquiera de las diluciones usadas y el grupo de jerbos testigo. La producción de anticuerpos en un principio se asemeja a una respuesta primaria clásica contra un antígeno (Bach, 1984), en donde el período de latencia es de 10 días y la parte alta se presenta a los 20 días, sin embargo, no se observó una fase de reducción de niveles de anticuerpos. La ausencia de una fase de reducción seguramente se debe a la continua estimulación del sistema inmunológico por la permanencia de larvas en los tejidos, en este trabajo se recolectó gran número de larvas en la carcaza y en el cerebro hasta el día 60 p.i. en que se realizó el último muestreo, además en otros trabajos se han encontrado larvas y antígenos en tejidos hasta 8 meses después de la infección (Parsons et al., 1986).

Los títulos de anticuerpos oculares contra Ag-SET en jerbos inoculados con hITc empiezan a aumentar partir del día 30 p.i. , entre los días 40 y 130 p.i. se presentaron diferencias ( $p < 0.05$ ) entre el grupo de jerbos inoculados en cualquiera de las diluciones usadas y el grupo de jerbos control. Normalmente no existe tejido linfoide asociado al globo ocular, por lo que se considera que los pocos anticuerpos presentes en líquido intraocular son trasudados séricos, esto explicaría en parte porque los anticuerpos específicos contra

Ag-SET a nivel ocular aparecen después que los anticuerpos a nivel sérico y los niveles son menores.

No obstante que lo anterior resulta lógico, no es necesariamente cierto, puesto que en humanos se ha relacionado la presencia de anticuerpos oculares a pacientes con LMO, y se considera que la presencia de anticuerpos específicos contra Ag-SET en líquidos oculares sólo se presenta en pacientes con LMO ( Benitez del Castillo et al., 1995; Biglan et al., 1979; Glickman et al., 1979; Glickman et al., 1985; López-Velez y cols., 1995; Pollard et al., 1979). Si sólo fueran anticuerpos trasudados, cualquier persona con anticuerpos específicos en suero tendría algún nivel de anticuerpos en líquidos intraoculares y esto no ocurre. Por lo que probablemente las lesiones en capilares y tejidos oculares ocurridas por la migración larvas de *T. canis* en ojos, son las responsables del paso de anticuerpos. En el presente trabajo se aportan datos que sugieren otra posible explicación, en algunos jerbos se detectaron a nivel ocular lesiones con aspecto de granulomas y un tejido que morfológicamente asemeja tejido linfoide (figura 38d), los linfocitos de este tejido podrían ser en parte los responsables de la producción de anticuerpos oculares. Un estudio posterior acerca de las poblaciones celulares presentes en este tejido podrán dar una respuesta a esta interrogante.

El análisis del reconocimiento antigénico mostró una reactividad gradual hacia los Ag-SET, los sueros de los jerbos sacrificados el día 20 p.i. reconocieron una banda de 32 kDa, los sacrificados el día 30 reconocieron bandas de 120, 32, 29 y 24 kDa, los sacrificados el día 40 y 60 reconocieron bandas de 120, 70, 66, 55, 32, 29 y 24 kDa y los sacrificados el día 130 p.i. reconocieron bandas de 200, 120, 70, 66, 55, 32, 29 y 24 kDa. Este gradual reconocimiento de los antígenos, probablemente se deba a que no todos los Ag-SET se secreten al mismo tiempo dentro del jerbo, no existen reportes de cinética de reconocimiento antigénico en otros modelos experimentales, pero se ha demostrado que larvas cultivadas in vitro producen una variación en cuanto a la cantidad de Ag-SET con respecto al tiempo de mantenimiento en cultivo (Badley et al., 1987).

La producción de anticuerpos no indujo la protección en los jerbos infectados, esto se demuestra cuando se observa que la presencia de anticuerpos no redujo el número total de larvas recuperadas en los órganos muestreados. Los mecanismos involucrados en esta

falta de protección pueden ser varios, el primero de ellos puede estar relacionado a que la respuesta de anticuerpos se monta principalmente contra los Ag-SET y estos se secretan al exterior del parásito (Maizels et al., 1984, Page et al., 1992b, Page et al., 1992c), se ha demostrado que larvas de *T. canis* dejan Ag-SET en los tejidos de sus hospederos (Parsons et al., 1986) y de esta manera podría quedar protegida la larva del reconocimiento por anticuerpos y la subsecuente fijación del complemento o de células efectoras. Además, es posible que algún componente de los Ag-SET tenga un efecto quimiotáctico sobre neutrófilos y eosinófilos como ya ha sido demostrado para otros ascaroideos (Tanaka & Torisu, 1978; Tanaka et al., 1979). La anterior forma de inmunoevasión, parece ser confirmada por la observación frecuente en cortes histopatológicos de la presencia de larvas sin respuesta inflamatoria cerca de focos con un gran infiltrado celular (figuras 18CC, 20C, 27C, 27D, 30B y 30C).

Otro mecanismo de inmunoevasión propuesto es el efecto mitogénico de diferentes antígenos de *T. canis* sobre linfocitos B (Wang et al., 1995). Se ha sugerido que esta activación policlonal que no sólo se ha observado en *T. canis*, sino también en otros helmintos, puede inducir aumento de inmunoglobulinas, formación de autoanticuerpos (Fisher et al., 1981) y disminución de la función de células T (Yamashita et al., 1993). La glomerulitis y el engrosamiento observado en membranas basales de glomérulos renales, de los jerbos infectados, sugiere procesos de autoinmunidad, ya sea por presencia de complejos inmunes (cuadro tipo Arthus) en los glomérulos del riñón o por respuestas antimembrana basal desarrolladas por lesiones crónicas de los distintos parénquimas (Robbins, 1975).

En términos generales, los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman que los jerbos son un buen modelo de toxocariasis ocular y aportan datos que contribuyen al conocimiento de la patogenia e inmunología de la toxocariasis ocular y sistémica. Dentro de los aportes originales de este trabajo se encuentran: 1) Se evaluó de la cinética de migración de larvas de *T. canis* en los jerbos. 2) Se analizó y evaluó como evolucionan las lesiones en los diferentes órganos de los jerbos infectados. 3) Se estudiaron las lesiones oculares producidas por larvas de *T. canis* en los jerbos, este es el primer reporte de la inducción experimental de toxocariasis ocular producida por la inoculación oral de h1Tc en algún

modelo experimental. 4) Se describió como varían las cuentas leucocitarias a diferentes tiempos p.i. de hTc en los jerbos. 5) Se midió el efecto de la inoculación experimental de hTc sobre la ganancia de peso en jerbos. 6) Se analizó de la cinética de aparición de anticuerpos a nivel sistémico y ocular, este es el primer reporte de la cinética de producción de anticuerpos a nivel ocular en algún modelo experimental.. 7) Se evaluó de la cinética de reconocimiento antigénico de los diferentes Ag-SET en un modelo experimental.

Las perspectivas de este trabajo son amplias. En primer lugar se cuenta con un nuevo modelo experimental de toxocariasis ocular y sistémica en el cual se pueden realizar estudios más profundos de patología e inmunología de la enfermedad. En segundo lugar, el contar con un modelo experimental de toxocariasis ocular que permitirá realizar estudios profundos de evaluación de nuevos fármacos o de nuevas técnicas de diagnóstico a nivel ocular. Este trabajo se realizo con la finalidad de que el uso de este modelo experimental permita generar estudios comparativos entre este modelo experimental y humanos con síndrome de *larva migrans visceral* y/o *larva migrans ocular*.

## CONCLUSIONES

- La administración de las diferentes dosis de huevos larvados de *T. canis* en los jerbos indujo la infección en todos los animales inoculados
- En los tres grupos, a las doce horas p.i. el intestino presentó la mayor cantidad de larvas ( $p < 0.05$ ), posteriormente a las 24 y 72 horas p.i. la cantidad de larvas descendió rápidamente en este lugar y desapareció prácticamente el día 5 p.i..
- El corazón y los riñones fueron los órganos en los que se recuperó el mayor número de larvas en el grupo inoculado con 200 hITc a los 3 días p.i., posteriormente el día 5 p.i. el número de larvas recuperadas en estos órganos descendió y aumentó el número de larvas en la carcaza, hígado y pulmones. En los grupos inoculados con 1000 y 5000 hITc los pulmones y el hígado fueron los lugares en donde se recuperó el mayor número de larvas los días 3 y 5 p.i., posteriormente el número de larvas desciende en estos órganos.
- En los tres grupos, entre los días 10 y 60 p.i. los tejidos con mayor número de larvas recuperadas fueron la carcaza y el cerebro.
- En los jerbos inoculados con 1000 y 5000 hITc se detectaron en forma constante pequeñas cantidades de larvas en ojos entre los días 5 y 60 p.i.. En el grupo inoculado con 200 hITc sólo se detectaron algunas larvas en ojos los días 30 y 60 p.i..
- Se presentó leucocitosis sanguínea en los tres grupos de jerbos inoculados con hITc los días 5, 10 y 20 p.i..
- Se presentó linfocitosis los días 10 y 20 p.i. en los jerbos inoculados con 200 hITc y a los 5 y 20 días p.i. en los grupos inoculados con 1000 y 5000 hITc.

- Se detectó eosinofilia el día 60 p.i. en el grupo de jerbos inoculado con 200 hlTc. La eosinofilia en los grupos de jerbos inoculados con 1000 y 5000 hlTc se presentó los días 5 y 40 p.i..
- Se detectó neutrofilia los días 10 y 20 p.i. en el grupo de jerbos inoculados con 200 hlTc, los días 5, 10 y 20 p.i. en el grupo inoculado con 1000 hlTc y el día 10 p.i. en el grupo inoculado con 5000 hlTc.
- Se detectó una monocitosis entre los días 5 al 40 p.i. en el grupo de jerbos inoculados con 200 hlTc, los días 5, 10, 20, 30 y 60 p.i. en el grupo inoculado con 1000 hlTc y los días 5, 20 y 30 p.i. en los jerbos del grupo inoculado con 5000 hlTc.
- No se presentaron diferencias estadísticas en la cantidad de hemoglobina en sangre o en el número de plaquetas entre los diferentes grupos jerbos inoculados con hlTc y sacrificados a diferentes periodos de tiempo y un grupo de jerbos no inoculados.
- La migración de las larvas de *T. canis* a los diferentes órganos de los jerbos inoculados se realiza de varias maneras. La primera de estas formas es por vía sanguínea. La segunda vía de migración es por pared de vasos sanguíneos. La tercera forma de migración puede ser por continuidad anatómica de un órgano a otro.
- Las larvas penetran por diferentes partes del intestino, algunas permanecen en serosa de 1 a 3 días provocando abundantes focos de inflamación aguda alrededor de las larvas, éstas, posteriormente migran a otros órganos y las lesiones desaparecen.
- La evolución de las lesiones en hígado, pulmones y riñones los primeros días p.i. (1, 3 y 5 días) son lesiones de tipo agudo con larvas e infiltrado de neutrófilos y eosinófilos. Posteriormente, empieza a disminuir las larvas en los órganos y las lesiones tienden a la cronicidad con infiltrados de linfocitos, macrófagos y presencia de fibrocitos y

colágena. Se observaron algunas lesiones de tipo agudo entre los días 30 y 60 p.i., probablemente se deben a la migración de algunas larvas por estos lugares.

- La presencia de glomerulitis y engrosamiento generalizado de las membranas basales observado en riñones de jerbos inoculados con hTc sugieren procesos de hipersensibilidad por complejos inmunes o contra membrana basal.
- Se observó en los jerbos inoculados con hTc la existencia de leucopoyesis. El aumento de tejido linfoide asociado a bronquios y el aumento de actividad celular, así como del tamaño del bazo, confirman esta aseveración.
- La respuesta inflamatoria que se monta contra las larvas de *T. canis* en cerebro los jerbos inoculados con 1000 hTc, entre los días 10 y 20 p.i. es ligera, pero aumenta de intensidad entre los días 30 y 60 p.i. sobre todo alrededor de los vasos sanguíneos. Los días 40 y 60 p.i. se presentaron pequeñas zonas de degeneración y algunas larvas sin ningún tipo de respuesta alrededor.
- La aparición de zonas de degeneración en cerebro a partir del día 40 correlacionó con la aparición de manifestaciones nerviosas en los jerbos, principalmente incoordinación.
- Los jerbos sacrificados entre el día 1 y 20 p.i. no presentaron ninguna alteración en párpados, pero 10 de los 15 jerbos sacrificados entre el día 30 y 60 p.i. presentaron edema palpebral en el momento del sacrificio. Algunos presentaron ceguera.
- Las lesiones observadas en ojos de los jerbos inoculados fueron parecidas a las lesiones reportadas en humanos con *larva migrans ocular*. Entre las lesiones reportadas en humanos y las observadas en los jerbos se encuentran: granulomas en retina y en procesos ciliares, infiltración de células inflamatorias en humor vítreo, hemorragias retinales, desprendimiento de retina, destrucción de retina, hemorragias en procesos ciliares y retinitis.

- La ganancia de peso en los animales del grupo no inoculados, es mayor ( $p < 0.05$ ) que en el grupo inoculado con 1000 hITc. a partir del día 30 y hasta el día 130 p.i. en que terminó el experimento.
  - Se identificaron en geles SDS-PAGE un total de 7 bandas en los Ag-SET. Las bandas determinadas correspondieron a 200, 126, 119, 70, 32, 28 y 24 kDa. La banda más fuertemente teñidas fue la de 32 kDa, lo que indica que es la más abundante en el conjunto de los Ag-EST obtenidos.
  - Los títulos de anticuerpos séricos contra Ag-SET en el suero de jerbos inoculados con 1000 hITc empiezan a aumentar partir del día 10 p.i. , entre los días 20 y 130 p.i. se presentaron diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo de jerbos inoculados y el grupo de jerbos control.
  - Los títulos de anticuerpos oculares contra Ag-SET en jerbos inoculados con 1000 hITc empiezan a aumentar partir del día 30 p.i. , entre los días 40 y 130 p.i. se presentaron diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo de jerbos inoculados con larvas de *T. canis* y el grupo de jerbos control.
  - El análisis del reconocimiento antigénico mediante la técnica de Western blot mostró una reactividad gradual hacia estos antígenos, los sueros de los jerbos sacrificados el día 20 p.i. reconocieron en forma leve una banda de 32 kDa, los sacrificados el día 30 reconocieron bandas de 120, 32, 29 24 kDa, los sacrificados el día 40 y día 60 reconocieron bandas de 120, 70, 66, 55, 32, 29 y 24 kDa y los sueros de los sacrificados el día 130 p.i. reconocieron bandas de 200, 120, 70, 66, 55, 32, 29 y 24 kDa .
- Los jerbos son un buen modelo experimental para el estudio de la toxocariasis ocular y sistémica.

## REFERENCIAS

- Abbas, A.K.; Lichtman, A. H. & Pober J.S. (1993). Cellular and Molecular Immunology. Ed. W.B. Saunders Company. USA.
- Abo-Shehada, M.N.; Al-Zubaidy, B.A. & Hebert, I.V. (1984). The migration of larval *Toxocara canis* in mice I. Migration through the intestine in primary infections. *Vet. Parasitol.*, 17: 65-73.---
- Abo-Shehada, M.N. & Herbert, I.V. (1984). The migration of larval *Toxocara canis* in mice II post-intestinal migration in primary infections. *Vet. Parasitol.*, 17: 75-83.
- Abo-Shehada, M.N.; Sharif, L.; Sukhon, S.N.; Abuharfeil, N. & Atmeh, R.F. (1992). Seroprevalence of *Toxocara canis* antibodies in humans in norther Jordan. *J. Helminthol.* 66 (1): 75-78
- Abo-Shehada, M.N. & Ziyadeh, Y. (1991). Prevalence of endoparasites in dog faecal deposits in Jordan. *J. Helminthol.* 65 (4): 313-314
- Agnihotri, R.K.; Bhatia, B.B. & Kumar, D. (1987). Visceral larva migrans. I. Migratory behaviour of *Toxocara canis* larvae in golden hamster and chicken. *Ind. J. Ann. Sc.*, 57 (8): 853-855.
- Agudelo, C.; Villareal, E.; Caceres, E.; López, C.; Eljach, J.; Ramirez, N.; Hernandez, C. & Corredo, A. (1990). Human and dogs *Toxocara canis* infection in a poor neighborhood in Bogotá. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 85 (1): 75-78.
- Alba, H.F. (1991). *Toxocara canis*, un problema de salud pública. *Av. Med. Vet.* 10 (5): 197-191.
- Alba, H.F. (1994). Manual de Prácticas de Parasitología Veterinaria. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM..
- Alba, H.F.; Flores-Alatorre, L.; Cuéllar, O.J.A.; Martínez, L.J.P. (1994). Desarrollo de un nuevo modelo de toxocariasis ocular. Memorias del XXV Congreso Nacional de Microbiología. Ciudad Obregon, Sonora.
- Aljeboori, T.I. & Ivey, M.H. (1970). *Toxocara canis* infections in baboons. I. Antibody, white-cell, and serum protein responses following infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 19: 249-254.
- Amir, J.; Harel, L.; Eidlitz-Markus, T. & Varsano, I. (1995). Lymphedema as a presenting sign of toxocariasis. *Infection.* 23(6): 389-390.
- Annen, J.M.; Eckert, J. & Hess, U. (1975). Simple method for obtaining *Toxocara canis* antigen for the indirect immunofluorescence technic. *Acta. Trop.*, 32 (1): 37-47.
- Anteson, R.K. & Corkish, J.D. (1975). An investigation of helminth parasites in well-cared for dogs in Accra. *Ghana. Med. J.* 14 (3): 193-195.
- Bach, J.F. . Immunología. Ed. LIMUSA. Mexico. D.F., 1984.
- Badley, J.L.; Grieve, R.B.; Bowman, D.D.; Glickman, L.T. and Rockey, J.H. (1987). Analisis of *Toxocara canis* larval Excretory-Secretory antigens: Phisicochemical characterization and antibody recognition. *J. Parasitol.* 73: 593-600 .
- Baéz, M. y Aleman, P. (1960). *Larva migrans visceral.* Primer caso comprobado en México. *Rev. Inst. Salubr. Enf. Trop.* 20: 168-171.
- Bardón, R.; Cuéllar, C. & Guillén J.L. (1995). Evaluation by larval recovery of Mebendazole antivity in experimental murine toxocariasis. *Int. J. Parasitol.*, 25 (5): 587-592.

- Barriga, O.O. & Myser W.C. (1987). Effects of irradiation on the biology of the infective larvae of *Toxocara canis* in the mouse. *J. Parasitol.* 73 (1): 89-94.
- Barrera, M.R. y Frago S.H. (1989), Frecuencia de parásitos gastrointestinales en perros de los municipios Cutzamala y Pungarabato del ed. de Guerrero. I Congreso nacional de parasitología veterinaria (memorias), Aguascalientes, Ags.. 50.
- Bass, J.I.; Mehta, K.A.; Glickman, L.T.; Blocker, R. & Eppes, B.M. (1987). Asymptomatic toxocariasis in children. A prospective study and treatment trial. *Clin. Pediatr. Phila.* 26 (9): 441-446.
- Beaugnet, F. and Gadat, R. (1993). Recherches d'oeufs de *Toxocara spp.* et de larves d'*Ankylostoma spp.* dans le sol a Noumea, Nouvelle Calédonie. *Rev. Med. Vet.* 114 (6): 523-525.
- Beaver, P.C.; Snyder, C.H.; Carrera, G.M.; Dent, J.H. and Lafferty, J.W. (1952). "Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans. Report of three cases". *Pediatrics.* 9:7.
- Beaver, P.C. (1969). The nature of visceral larva migrans. *J. Parasitol.*, 55: 3-12.
- Beaver, P.C.; Juns, R.C. and Cupp, E.W.: (1986). Parasitología clínica. 2ª. ed. Salvat. Barcelona, España.
- Benites del Castillo, J.M.; Herreros, G.; Guillen, J.L.; Fenoy, S.; Banares, A, & Garcia, J. (1995). Bilateral ocular toxocariasis demonstrated by aqueous humor enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Ophthalmol.*, 119 (4): 514-516.
- Biglan, A.W.; Glickman, L.T. & Lobes L.A. (1979). Serum and vitreous *Toxocara* antibody in nematode ophthalmitis. *Am. J. Ophthalmol.*, 88: 898-901.
- Bio-Rad: Trans Blot SD electrophoretic transfer cell instruction manul. Cat. 170-3940. 1996
- Bjerrum O.J. (1988). Handbook of immunoblotting of proteins Vol. I y II. Ed. CRC-PRESS. Florida, U.S.A..
- Borg, O.A. and Woodruff A.W. (1973). Prevalence of infective ova of *Toxocara* species in public places. *Br. Med. J.* 4:470-472.
- Bowman, D.D.; Grieve M.M. and Grieve R.B (1987). Circulating Excretory-Secretory antigen levels and specific antibody responses in mice infected with *Toxocara canis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36:75-82.
- Bryden, A.S. (1992). The prevalence of *Toxocara canis* ova in soil samples from parks and gardens in de london area. *Pub. Heal.* 105 (2): 167-168.
- Buijs, J.; Borsboom, G.; Germund Van, J.J.; Hazebroek, A.; Dongen Van, P.A.M.; Kapen Van, F. and Neijens, H.J. (1994). *Toxocara* seroprevalence in 5 year old elementary schoolchildren: relation with allergic asthma. *Am. J. Epidemiol.*, 40 (9): 839-847.
- Buijs, J.; Egbers, M.W. and Nijkamp, F.P. (1995). *Toxocara canis* induced airway eosinophilia and tracheal hyporeactivity in guinea pigs and mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 293(3): 207-215.
- Cartas-Chiñas, J. (1987). ESTADÍSTICA MÉDICA. Probabilidad y estadística descriptiva. Ed. LIMUSA. México D.F.
- Cerci, H. (1992). The distribution and public health importance of gastro-intestinal helminths in dogs in Elmadag area, Ankara. *Turk. Parazitol. Der.* 16 (1): 59-67.

- Chieffi, P.P.; Ueda, M.; Camargo, E.D.; de-Sauza, A.M.; Guedes, M.L.; Gerbi, L.J.; Spir, M. & Moreira A.S. (1990). *Visceral larva migrans*: a seroepidemiological survey in five municipalities of Sao Paulo state, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo.* 23 (3): 204-210.
- Chisid, M.J.; Dale, D.C.; West, B.C.; and Wolff, S.M. (1975). The hypereosinophilic syndrome. Analisis de fourteen cases with review of the literature. *Medicine*, 54: 1-27.
- Chobanov, R.E.; Gulieva, R.O. & Niftullaev, M.Z. (1990). A serological examination for toxocariasis in the population of greater Baku. *Med. Parazitol. Mosk.* 3: 35-38.
- Chomel, B.B.; Kasten, R.; Adams, C.; Lambillotte, D.; Theis, J.; Goldsmith, R.; Koss, J.; Chioino, C.; Widjana, D.P. & Sutisna, P. (1993). Serosurvey of some major zoonotic infections in children and teenagers in Bali, Indonesia. *Southeast. Asian. J. Trop. Med. Public. Health.* 24 (2): 321-325.
- Choo, L.N. (1990). Contamination of children's playgrounds with *Toxocara hookworm* larvae in Singapore. *Sing. Vet. J.* 14: 66-69.
- Church, E.M.; Wyand, D.S. & Lein, D.H. (1975). Experimentally induced cerebrospinal nematodiasis in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Am. J. Vet. Res.* 36 (3): 331-335.
- Cilia, C.; Perez-Trallero, E.; Gutierrez, C.; Part, C.; Gomariz, M. (1996). Seroprevalence of *Toxocara* infection in middle class and disadvantaged children in northern Spain (Gipuzkoa, Basque Country). *Eur. J. Epidemiol.*, 12 (5): 541-543.
- Coffman R.L.; Seymour, B.W.P.; Hudak, S.; Jackson, J. And Rennick, D. (1989). Antibody to interleukin-5 inhibits helminth induced eosinophilia in mice. *Science*, 245: 308-309.
- Cogan, M.G.. Líquidos y electrolitos, fisiología y fisiopatología. *Ed. Manual Moderno.*, México D.F., 1993.
- Coligan, J.E.; Kruisbeek, A.M.; Margulies, D.H.; Shevach E.M.; Strober, W.: Current protocols in immunology. *Published by John Willey & Sons, Inc.*, U.S.A., 1994.
- Collins, R.F. & Ivey, M.H. (1975). Specific and sensitivity of skin test reactions to extracts of *Toxocara canis* and *Ascaris suum*. I. Skin test done on infected guinea pigs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 24 (3): 455-459.
- Costa-Cruz, J.M.; Nunes, R.S.; Buso, A.G. (1994). Presença de ovos de *Toxocara spp* em pracas publicas da cidade de Uberlandia. Minas Gerais, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 36 (1): 39-42.
- Cruz, M.I.; Acevedo, E. y Romero, C. (1986). Frecuencia de helmintos en perros procedentes del centro antirrábico de Culhuacán, D.F.. VII Congreso nacional de parasitología (memorias). Puebla, Puebla.
- Cruz, M.I.; Romero, C. y Acevedo, E. (1987). Frecuencia de helmintos de perros y gatos sacrificados en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de Junio de 1986 a Mayo de 1987. VI Reunión de la Asociación Mexicana de Parasitología Veterinaria (memorias). Cuernavaca, Mor..
- Cruz, M.I.; Romero, C. y Acevedo, E. (1990). Analisis de los resultados de los exámenes coproparasitológicos practicados en heces de perros, en relación a raza, sexo y edad. *Rev. Mex. Parasitol.*, 3(1). 382.
- Cuéllar, C.; Fenoy, S. & Guillén, J.L. (1995). Cross-reactions of sera from *Toxascaris leonina* and *Ascaris suum* infected mice with *Toxocara canis*, *Toxascaris leonina* and *Ascaris suum* antigens. *Int. J. Parasitol.*, 25 (6): 731-739.
- Cypess, H.R. (1982). Visceral larva migrans. In Parasitic zoonoses. ed . Steel H.J. 205-212.

- Cypess, R.H.; Karol, M.H.; Zidian, J.L.; Glickman, L.T. & Gitlin, D. (1977). Larva specific antibodies in patients with visceral larva migrans. *J. Infect. Dis.*, 135 (4): 633-640.
- Dada, B.J.; Adegboye, D.S. & Mohammed, A.N. (1979). A survey of gastrointestinal helminth parasites of stray dogs in Zaria, Nigeria. *Vet. Rec.*, 104 (7): 145-146.
- Dada, B.J.O. and Lindquist W.D. (1979). Studies on flotation techniques for the recovery of helminth eggs from soil and the prevalence of eggs of *Toxocara* spp in some Kansas public places. *JAVMA*, 174: 1208-1210.
- Dafalla, A.A. (1975). The serodiagnosis of human toxocariasis by the capillary-tube precipitin test. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 69 (1): 146-147.
- Daniel, W.W. (1974). Biostatistics. Foundation for analysis in the health sciences. Ed. John Willey & Sons, Inc.
- DeBuen, S.; Biagi, F. y Pérez, R.T. (1966). Primer caso de toxocariasis ocular en México. *Pres. Med. Méx.*, 1:168-171.
- Deplazes, P.; Guscetti, F.; Wunderlin, E.; Bucklar, H.; Skaggs, J. & Wolff, K. (1995). Endoparasite infection in stray and abandoned dogs in southern Switzerland. *Schweiz Arch. Tierheilkd.* 137 (5): 172.179.
- Desai, U.R.; Blinder, K.J. and Dennehy, P.J. (1996). Vitrectomy and juvenile epiretinal membrane. *Ophthalmic. Surg. Lasers.*, 27(2): 137-139.
- DeSavigni, D.H. (1975). In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *J. Parasitol.* 61: 781-782.
- DeSavigny, D.H. & Tizard, I.R. (1977). Toxocaral larva migrans: the use of larval secretory antigens in haemagglutination and soluble antigen fluorescent antibody tests. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 71 (6): 501-507.
- DeSavigni, D.H.; Voller, A. & Woodruff, A.W. (1979). Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. *J. Clin. Pathol.* 32 (3): 284-288.
- Dosowitz, R.S.; Rudoy, R. & Barnwell, J.W. (1981). Antibodies to canine helminth parasites in asthmatic and nonasthmatic children. *Int. Arch. All. Appl. Immunol.*, 65, 361.366.
- Douglas, J.R. & Beker, N.R. (1959). The chronology of experimental intrauterine infection with *Toxocara canis* (Werner, 1782) in the dog. *J. Parasitol.* 45: 43-44.
- Dubey, J.P. (1982). Induced *Toxoplasma gondii*, *Toxocara canis*, and *Isospora canis* infections in coyotes. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181 (11): 1268-1269.
- Dulley, J.R. & Grieve, P.A. (1975). A simple technique for eliminating interference by detergents in the lowry method of protein determination. *Annal. Biochem.*, 64:136-141.
- Dunn, A.M.: Helmintología Veterinaria. 2ª Edición. Manual Moderno (1983).
- Dunsmore, J.D.; Thompson, R.C.A. & Bates, I.A. (1983). The accumulation of *Toxocara canis* larvae in the brains of mice. *Int. J. Parasitol.*, 13 (5): 517- 521.
- Dunsmore, J.D.; Thompson, R.C.A. & Bates, I.A (1984). Prevalence and survival of *Toxocara canis* eggs in the urban environment of Perth, Australia. *Vet. Parasitol.* 16 (3): 303-311.

- Duwel, D. (1984). The prevalence of *Toxocara* eggs in the sand in children's playgrounds in Frankfurt. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 78 (6): 633-636.
- Eguia-Aguilar (1998). Análisis ecológico de comunidades de helmintos intestinales de perros obtenidos en centros de control canino del D.F., México. Memorias del XIII Congreso Nacional de Parasitología. Zacatecas, Zac..
- Ellis, G.S.; Pakalnis, V.A.; Worley, G.; Green, J.A.; Frothingham, T.E.; Sturner, R.A. & Walls, K.W. (1986). *Toxocara canis* infestation. Clinical and epidemiological associations with seropositivity in kindergarten children. *Ophthalmol.* 93 (8): 1031-1037.
- Emehelu, C.O. & Fakae, B.B. (1986). Prevalence of *Toxocara canis* ova on playgrounds of nursery schools in Nsukka, Nigeria. *Int. J. Zoonoses.* 13 (3): 158-161.
- Enayat, M.S. & Pezeshki, M. (1977). The comparison of counterimmunoelectrophoresis with indirect haemagglutination test for detection of antibodies in experimentally infected guinea pigs with *Toxocara canis*. *J. Helminthol.*, 51 (2): 143-148.
- Epe, C.; Ising-Volmer, S. & Stoye, M. (1993). Results of parasitological examinations of faecal samples from horses, donkeys, dogs, cats and hedgehogs between 1984 and 1991. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 100 (11): 426-428.
- Escalante, H.H. (1969). Contribución al estudio de las enfermedades de perros y gatos de México. Tesis de licenciatura. Fac. Med. Vet. Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F..
- Farias, N.A.; Christovao, M.L. & Stobbe N.S. (1995). Frequency of intestinal parasites in dogs (*Canis familiaris*) and cats (*Felis catus domestica*) in Aracatuba - Sao Paulo. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 4 (1): 57-60.
- Fattah, D.I.; Maizels, R.M., McLaren, D.J. & Spry, C.J.F. (1986). *Toxocara canis*: Interaction of human blood eosinophils with the infective larvae. *Exp. Parasitol.*, 61: 421-431.
- Fei-Chang Y. & Mo-Kang M. (1997). Survey for endoparasitic zoonosis in stray dogs and cats in Taipei, Taiwan. *J. Chin. Soc. Vet. Sci.*, 23 (1): 26-33.
- Fernández, P.A.M.; Martínez, B. I.; Vázquez, T.O. y Ruiz, H.O. (1996). Frecuencia de contaminación por *Toxocara* sp. En suelos de Ciudad Nezahualcóyotl, México. XII Congreso nacional de parasitología (memorias). Aguascalientes, Ags. 59.
- Fisher, E.; Camus, D.; Santoro, F. & Capron, A. (1981). *Schistosoma mansoni*: autoantibodies and polyclonal B cell activation in infected mice. *Clin. Exp. Immunol.*, 46: 89-93.
- Flores-Alatorre, H.L. (1993). Estudio histopatológico de las lesiones causada por larvas de *Toxocara canis* en ojos de gerbos (*Meriones unguiculatus*). Tesis de licenciatura, FES-Cuautitlán UNAM.
- Flores, B.L. (1955). Helmintos de perros y gatos (*Canis familiaris*) y gatos *Feliculatus* de la ciudad de México. *Anal. Esc. Nal. C. Biol.* 8(3 y 4): 159-202.
- Franyuti, O.M. (1970). Incidencia de parásitos gastrointestinales en cánidos de la ciudad de Veracruz. Tesis de licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot.. Universidad Veracruzana.
- Fulleborn, F. (1921). Askarisin fertion durch verzehren eingekapselter larven und uber gelungene intrauterine askarisin fertion. *Arch. Schiffs Tropen. Hyg.* 25: 367-375

- Garvey, J.S.; Cremer, N.E. & Sussdorf, D.H.: Methods in immunology. 3th ed. *W.A. BENJAMIN, INC. ADVANCED BOOK PROGRAM*, Massachusetts, U.S.A., 1977.
- Garza, T.A. (1972). Helminthiasis encontradas en necropsias de 100 perros (*Canis familiaris*) en Monterrey, N.L.. Tesis de licenciatura. Esc. Med. Vet.. Universidad Autonoma de Tamaulipas.
- Gass, J.D. & Braunstein, R.A. (1983). Further observations concerning the diffuse unilateral subacute neuroretinitis syndrome. *Arch. Ophthalmol.* 101 (11): 1689-1697.
- Gavin, I.J. (1964). Experimental *Toxocara canis* infection in chicken and pigeons. *J. Parasitol.*, 50: 124-127.
- Gaxiola, C.S.M.; Obregón, J.F.; Domínguez, J.E.; Pérez, C.J.; Caro, P.J.; García, H.L.; Martínez, G.M. y Reyes, M.O. (1996). Frecuencias de Parásitos gastrointestinales en perros de Culiacán Sinaloa, México. XII Congreso Nacional de Parasitología, Aguascalientes, aguascalientes. 67.
- Genchi, C.; Di-Sacco, B.; Gatti, S.; Sangalli, G. & Scaglia, M. (1990). Epidemiology of human toxocariasis in northern Italy. *Parassitologia.* 32 (3): 313-319.
- Glickman, L.; Cypess, R. & Crumrine, P.K. (1979). *Toxocara* infection and epilepsy in children. *J. Pediatr.*, 1: 75-78.
- Glickman, L.; Cypess, R.; Hiles, D. & Gessner, T. (1979). *Toxocara* specific in the serum and aqueous humor of a patient with presumed ocular and visceral toxocariasis. *Am J. Trop. Med. Hyg.*, 28(1): 29-35.
- Glickman, L.T.; Grieve, R.V.; Lauria, S.S. & Jones, D.L. (1985). Serodiagnosis of ocular toxocariasis: a comparison of two antigens. *J. Clin Pathol.*, 38 (1): 103-107.
- Glickman, L.T.; Schantz, P.M. & Cypess, R. (1979). Epidemiological characteristics and clinical finding in patients with serologically proven toxocariasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 73: 254-258.
- Glickman, L.T.; Schantz, P.M.; Dombroske, E.R. & Cypess, R. (1978). Evaluation of serodiagnostic tests for *visceral larva migrans*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 27: 492-498.
- Glickman, L.T. & Shofer, F.S. (1987). Zoonotic visceral and ocular *Larva migrans*. *Vet. Clin. Nth. Am. Small Ann. Pract.* 17 (1): 39-53.
- Glickman, L.T. & Summers, B.A. (1983). Experimental *Toxocara canis* infection in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *Am J. Vet. Res.* 44 (12): 2347-2354.
- Guberti, V.; Stancampiano, L. & Francisci, F. (1993). Intestinal helminth parasite community in wolves (*Canis lupus*) in Italy. *Parassitologia.* 35 (1): 59-65.
- Gueglio, B.; de-Gentile, L.; Nguyen, J.M.; Achard, J.; Chabasse, D. & Marjolet, M. (1994). Epidemiologic approach to human toxocariasis in western France. *Parasitol. Res.* 80 (6): 531-536.
- Gunaseelan, L.; Ganesan, P.I.; Ramadass, P.; Basheer, M.A. & Raghavan, N. (1992). Incidence of *Toxocara ova* in the environment. *Ind. Vet. J.* 69 (4): 308-309.
- Hakim, S.L.; Mark, J.W. & Lam, P.L. (1993). ELISA seropositivity for *Toxocara canis* antibodies in Malaysia, 1989-1991. *Med. J. Res.* 48(3): 303-307.
- Hames, B.D. & Rickwood, D. (1981). Gel electrophoresis of proteins: A practical approach. Ed. ILR Press. Oxford, Gran Bretaña.

- Haralabidis, S.T.; Papazachariadou, M.G.; Koutinas, A.F. & Rallis, T.S. (1988). A survey on the prevalence of gastrointestinal parasites of dogs in the area of Thessaloniki, Greece. *J. Helminthol.* 62 (1): 45-49.
- Hassan, I.C. (1984). A five-year analysis of diseases of dogs and cats in the veterinary clinic of Freetown, Sierra Leone. *Beitr. Trop. Landwirt. Vet.* 22 (3): 305-308.
- Havasiová, K.; Dublinsky, P. & Stefancikova, A. (1993). A seroepidemiological study of human *Toxocara* infection in the Slovak Republic. *J. Helminthol.* 67 (4): 291-296.
- Havasiová-Reiterová, Tomasovicová, O. & Dublinský, P. (1995). Effect of various doses of infective *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs on the humoral response and distribution of larvae in mice. *Parasitol. Res.* 81: 13-17.
- Herrmann, N.; Glickman, L.T.; Schantz, P.M.; Weston, M.G. & Domanski, L.M. (1985). Seroprevalence of zoonotic toxocariasis in the United States. *Am. J. Epidemiol.* 12 (5): 890-896.
- Hill, I.R.; Denham, D.A. & Scholtz, C.L. (1985). *Toxocara canis* larvae in the brain of a British child. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79: 351-354.
- Hinz, E. (1980). Int. Helminths in Bangkok stray dogs and their role in public health. *Zentralbl. Bakteriolog. Hyg. B.* 17 (1): 79-85.
- Hinz, E. & Blatz, I. (1985). Intestinal helminths of domestic dogs in the Hessian Neckar Valley, Federal Republic of Germany. *Int. J. Zoonoses.* 12 (3): 211-213.
- Holland, C.; O'Conno, P.; Taylor, M.R.H.; Hughes, G.; Girdwood, R.W.A. & Smith, H. (1991). Families, parks, gardens and toxocariasis. *Scand. J. Infec. Dis.* 23 (2): 225-231.
- Holland, C.; O'Lorcain, M.R.; Taylor M.R.H. & Kelly A. (1995). Sero-epidemiology of toxocariasis in school children. *Parasitol.* 110: 535-545.
- Holt, P.E.; Clarson M.J. & Kerslake, M. (1981). Anthelmintic test on *Toxocara canis* infection in mice. *Vet. Rec.* 4: 308-309.
- Horn, K.; Schenieder, T. & Stoye, M. (1990). Contamination of public children's playgrounds with helminth eggs in Hannover. *Deut. Tier. Wonchen.* 97 (3): 124-125.
- Huntley, C.C.; Costas, M.C. & Lyerly, A. (1965). Visceral larva migrans syndrome: Clinical characteristics and immunologic studies in 51 patients. *Pediatrics*, 36 (4): 523-536.
- Hurley, D.; Aguilar, A.; Garibay, J. y Landeros, J. (1981). Técnicas de diseño experimental. Departamento de Matemáticas del CINVESTAV. México D.F.
- Igarashi, K. & Yatomi, K. (1992). *Toxocara* egg contamination of sand-pits in public parks in the Higashi-Harima region, Hyogo prefecture. *J. Jap. Vet. Med. Assoc.* 45 (8): 597-599.
- Ióvine, E. y Selva, A.O. (1979). El laboratorio en la clínica. 2da. ed.. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Jacquier, P.; Gottstein, B.; Stingelin Y. & Eckert, J. (1991). Immunodiagnosis of toxocariosis in humans: evaluation of a new enzyme linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, 29: 1831-1835.
- Jansen, J; Knapen, F. van; Schereurs, M.; Wijngaarden, T. van, Van-Knapen, F. & Van-Wijngaarden, T. (1993). *Toxocara* eggs in public parks and sand-boxes in Utrecht. *Tijdschrift-voor-Diergeneeskunde* 118 (19): 611-614.

Jaskoski, B.J.; Barr, V. & Borges, M. (1982). Intestinal parasites of well-cared for dogs: an area revisited. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31 (6): 1107-1110.

Jimenez, J.F.; Valladares, B.; Fernandez-Palacios, J.M.; Armas de, F.; Castillo de, A. (1997). A serologic study of human toxocariasis in the Canary Island (Spain): environmental influences. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 56 (1): 113-115.

Johnston, J. & Gasser, R.B. (1993). Copro-parasitological survey of dogs in southern Victoria. *Aust. Vet. Pract.* 23 (3): 127-131.

Jones, R.E.; Finkelman, F.R.; Hester, R.B. & Kayes, S.G. (1994). *Toxocara canis*: Failure to find IgE Receptors (FcεR) on eosinophils from infected mice suggests that murine eosinophils do not kill helminth larvae by an IgE-dependent mechanism. *Exp. Parasitol.*, 78: 64-75.

Jones, W.E.; Schantz, P.M.; Foreman, K.; Smith, L.K.; Witte, E.J.; Schooley, D.E. & Juranek, D.D. (1980). Human toxocariasis in a rural community. *Am. J. Dis. Child.* 134 (10): 967-969.

Jordan, H.E.; Mullins, S.T. & Stebbins, M.E. (1993). Endoparasitism in dog: 21583 cases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 203(4): 547-549.

Kayes, S.G. & Oaks, J.A. (1976). Effect of inoculum size and length of infection on the distribution of *Toxocara canis* larvae in the mouse. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 25 (4): 573-580.

Katic-Radivojevic, S. & Popovic, I. (1992). Intestinal helminth fauna of stray dogs in Bar and other town on the Montenegrin coast. *Vet. Glasnik* 46 (11): 681-685.

Kazacos, K.R. (1978). Gastrointestinal helminths in dogs from a humane shelter in Indiana. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173 (8): 995-997.

Kennedy, J.D.; Carl, W.P. & Lake, J.P. (1992). Extrathymic T. cell maturation: phenotypic analysis of T cell subsets in nude mice as a function of age. *J. Immunol.*, 148: 1620-1626.

Kirk, R.W. (1984). *Práctica de clínica canina en pequeñas especies*. 4ª. Ed. Edit. Interamericana. Mexico D.F..

Knapen F-van; Buijs, J.; Kortbeek, L.M.; Ljungstrom, I. & Van-Knapen, F. (1992). Larva migrans syndrome: *Toxocara*, *Ascaris*, or both?. *Lancet Brit. ed.* 340: 550-551.

Krupp, I.M. (1975). Hemagglutination test for the detection of antibodies specific for *Ascaris* and *Toxocara* antigens in patients with suspected visceral larva migrans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 23 (3): 388-374.

Kusama, Y.; Takamoto, M.; Kasahara, T.; Takatsu, K.; Nariuchis, H. & Sugane, K. (1995). Mechanisms of eosinophilia in BALB/c-un/+ and congenitally athyic BALB/c-un/un mice infected with *Toxocara canis*. *Immunology*, 84: 461-468.

Laemli, W.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

Lamina, J. (1980). Larva migrans visceralis infektionen durch *Toxocara* Arten. Ergebnisse zehnjähriger serologischer Untersuchungen. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 105 (22): 796-799.

Lee, K.T.; Min, H.K. & Soh, C.T. (1976). Transplacental migration of *Toxocara canis* larvae in experimentally infected mice. *J. Parasitol.* 62 (3): 460-465.

- Lightner, L.; Christensen, B.M. & Beran G.W. (1978). Epidemiologic findings on canine and feline intestinal nematode infections from records of the Iowa State university veterinary clinic. *JAVMA* 172 (5): 564-567.
- Limaye, A.P.; Abrams, J.S.; Silver, J.E.; Ottesen, E.A. & Nutman, T.B. (1990). Regulation of parasite induced eosinophilia: selectively increased interleukin-5 production in helminth infected patient. *J. Exp. Med.*, 172: 399-405.
- Liotet, S.; Bloch, M.E.; Petithory, J.C.; Betellier, L. & Chaumeil, C. (1992). Biological modifications of the vitreous in intraocular parasitosis: Preliminary study. *Int. Ophthalmol.* 61(2): 75-80.
- Ljungstrom, I. & Van-Knapen, F. (1989). An eoidemiological and serological study of *Toxocara* infection in Sweden. *Scand. J. Infect. Dis.* 21(1): 87-93.
- Lokman-Hakim, S.; Thadasavanth, M.; Raden-Shamilah, R.H. & Yogeswari, S. (1997). Prevalence of *Toxocara canis* antibody among children with bronchial asthma in Klang Hospital, Malaysia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 91: 528-529.
- Lombardi, S., Vegni-Talluri, M.; Banchieri, L. & Esposito, F. (1990). The in vitro adherence of murine eosinophils, neutrophils and non-induced and induced macrophages to infective larvae of *Toxocara canis*. (*Nemátoda, Ascaridae*). *Int. J. Parasitol.*, 20: 603-613.
- Lopez-Velez, R.; Suárez de Figueroa, M.; Gimeno, L.; Garcia-Camacho, A.; Fenoy, S.; Guillen, J.L. y Castellote L. (1995). Toxocariasis ocular o retinoblastoma?. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 13 (4): 242-245.
- Lowichik, A. & Ruff, A.J. (1995). Parasitic infections of the central nervous system in children. Part II: Disseminated infections. *J. Child. Neurol.* 10 (2): 77-87.
- Luna, L.G. (1968). Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. Third edition. Ed. McGraw-Hill, Inc., USA.
- MacAdam, I.; Gudan, D.; Timbs, D.V.; Urquhart, H.R. & Sewell, M.M. (1984). Metazoan parasites of dogs in Sabah, Malaysia. *Trop. Anim. Health. Prod.* 16 (1): 34-38.
- Magnaval, J.F.; Fabre, R.; Maurières, P.; Charlet, J.P. & Larrard B. (1991). Application of the Western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitol. Res.* 77: 697-702.
- Magnaval, J.F.; Galindo, V.; Glickman, L.T. & Clanet, M. (1997). Human *Toxocara* infection of the central nervous system and neurological disorders: a case control study. *Parasitol.*, 115: 537-543.
- Mahdi, N.K. & Ali, H.A. (1993). *Toxocara* eggs in the soil of public places and schools in Basrah, Iraq. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 87(2):201-205.
- Mahmoud, A.A.F. (1989). Parasitic protozoa and helminths: biological and immunological challenges. *Science*, 246: 1015-1022.
- Maizels, R.M.; Kennedy, M.W.; Meghji, M.; Robertson, B.D. & Smith, H.V. (1987). Shared carbohydrate epitopes on distinct surface and secreted antigen of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *J. Immunol.* 139: 207-214.
- Maizels, R.M.; Savigny, D. & Ogilvie, B.M. (1984). Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. *Parasitol. Immunol.* 6: 23-34.
- Malloy W.F. & Embil J.A. (1978). Prevalence of *Toxocara spp* and other parasites in dogs and cats in Halifax, Nova Scotia. *Can. J. Med.* 42: 29-31.

- Manual Merk (1988). Tercera edición. Ed .Centrum.
- Margo, C.E.; Sedwick, L.A. & Rubin, M.L. (1986). Neuroretinitis in presumed visceral larva migrans. *Retina*. 6 (2): 95-98.
- Markell, E.M.; Voge, M. & John, T.D.: Medical Parasitology. W.B. Saunders Company, USA. 1986.
- Martínez, A.A. (1989). Toxocariasis canina. *Av. Med. Vet.* 6 (6) 272-276.
- Martínez-Barbosa, I.; Fernandez, P.A.; Vázquez, T.O.; Ruíz, H.A. y Ruiz G.L. (1996). Contaminación de áreas verdes por perros parasitados con *Toxocara canis* en el sur del Distrito Federal. XII Congreso nacional de parasitología (memorias), Aguascalientes, Ags.. 58.
- Martínez, B.I.; Fernández, P.A.M.; Vázquez, T.O. & Gutierrez, C.M. (1998). Frecuencia de helmintos en perros del distrito federal. Memorias del XIII Congreso Nacional de Parasitología. Zacatecas, Zac.
- Maruyama, S.; Nino, T.; Yamamoto, K. & Katsube, Y. (1994a). Parasitism of *Toxocara canis* larvae in chickens inoculated with the ascarid eggs. *J. Vet. Med. Sci.* 56(1): 139-141.
- Maruyama, S.; Yamamoto, K.; Katsube, Y (1994b). Infectivity of *Toxocara canis* larvae from Japanese quail in mice. *J. Vet. Med. Sci.* 56(2): 399-401.
- Matri-el, L.; Ghorbal, M.; Ayadi, A.; Ben-Naceur B. & Triki, M.F. (1990). Localisation oculaire a *Toxocara canis* apparemment bilaterale. *J. Fr. Ophthalmol.* 13 (5): 303-308.
- Medway, W. (1969). Veterinary Clinical Pathology, Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
- Meghi, N. & Maizels, R.M. (1986). Biochemical properties of larval excretory-secretory glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 18: 155-170.
- Mercer, R.; Lund, H. & Bloomfield, R. (1950). Larval ascariasis as a cause of chronic eosinophilia with visceral manifestations. *Am J. Dis. Child.* 80: 46-58.
- Merril, C.R.; Goldman, D. & Van Keuren, M.L. (1984). Gel protein: silver stains. *Meth. Enzymol.*, 104: 441-447.
- Mihara, F.; Gupta, K.L.; Joslyn, J.N. & Haik, B.G. (1993). Intraocular hemorrhage and mimicking lesions: role of gradient-echo and contrast-enhanced MRI. *Clinical Imaging.*, 17 (3): 171-175.
- Mikhael, N.Z.; Montpetit, V.J.A. & Orizaga, M. (1974). *Toxocara canis* infestation with encephalitis. *Can. J. Neurol. Sci.*, 1: 114-120.
- Minvielle, M.C.; Pezzani, B.C. & Basualdo-Farjat, J.A. (1993). Frecuencia de hallazgo del huevos de helmintos en materia fecal canina recolectada en lugares públicos de la ciudad de la Plata, Argentina. *Bol. Chil. Parasitol.* 48(3-4): 63-65.
- Moore, M.T. (1962). Human *toxocara* encephalitis with lead encephalopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 21:201-218.
- Mora de la, A.J. (1973). Encuesta de parasitosis en la ciudad de Guadalajara y San Martín Hidalgo, Jalisco. Tesis de licenciatura. Esc. De Med. Vet. y Zoot.. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco.
- Mosmann, T.R. & Coffin R.L. (1989): TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev. Immunol.*, 7: 145-173.

- Nakamura, S.; Sotoyama, T.; Hayasaka, S.; Kameyama, Y.; Maruyama, S. & Katsube, Y. (1991). Parasitism of *Toxocara canis* larvae in Japanese quail by inoculation of the ascarid eggs. *J. Vet. Med. Sci.* 53 (5): 865-872.
- Nakauchi, K.; Ohtaka, H. & Hiki, M. (1993). A survey on *Toxocara canis* of stray dogs in Ibaraki Prefecture, *Jap. J. Parasitol.* 42 (4): 365-367.
- Nelson, S.; Greene T. & Ernhart c.b. (1996). *Toxocara canis* infection in preschool age children: risk factors and the cognitive development of preschool children. *Neurotoxicol. Teratol.*, 18 (2): 167-174.
- Nicholas, W.L.; Stewart, A.C. & Mitchell, G.F. (1984). Antibody responses to *Toxocara canis* using sera from parasite infected mice and protection from toxocariasis by immunisation with E/S antigens. *Ast. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 62:619-626.
- Nicholas, W.L.; Stewart, A.C. & Walker, J.C. (1986). Toxocariasis: a serological survey of blood donors in the Australian Capital Territory together with observations on the risks of infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80 (2): 217-221.
- Niedfeld, G.; Pezzani, B.; Minvielle, M. & Basualdo-Farjat, J.A. (1993). Presence of lipids in the secretory/excretory product from *Toxocara canis*. *Vet. Parasitol.*, 51 (1): 155-158.
- Nielsen, K.; Fogh, L. & Anderson, S. (1974). Eosinophil response to migrating *Ascaris suum* larvae in normal and congenitally thymusless mice. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 82: 919-925.
- Nowotny, A.: Basic exercises in immunochemistry. A laboratory manual. *Springer-Verlag*, New York, U.S.A., 1979.
- Ohima, T.: Standardization of techniques for infecting mice with *Toxocara canis* and observations on normal migration routes of the larva. *J. Parasitol.* 47: 652-656 (1961).
- O'Lorcain, P. (1994a). Prevalence de *Toxocara canis* ova in public playgrounds in the Dublin area of Ireland. *J. Helminthol.* 68(3):237-241.
- O'Lorcain, P. (1994b). Epidemiology of *Toxocara spp* in stray dogs and cats in Dublin, Ireland. *J. Helminthol.* 68(4): 331-336.
- Olsen, O.W. (1974). Animal parasites. Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A.
- Olsen, O.W. (1979). Animal parasites, their life cycles and ecology. 3<sup>a</sup>. ed . Universal Park Press. USA.
- Olson, L.J. & Rose, J.E. (1966). Effect of *Toxocara canis* infection on the ability of white rats to solve maze problems. *Exp. Parasitol.*, 19: 77-84.
- Overgaauw, P.A.M. (1997). Prevalence of intestinal nematodes of dogs and cats in the Netherlands. *Vet. Q.*, 19(1): 14-17.
- Owolo, M.J.; Ndikuwera J.; Musasira, S.C.M. & Mushuku, A. (1991). Study of Chinamora Communal land dogs: endoparasites. *Zimb. Vet. J.* 22(2): 73-74-
- Page, A.P.; Hamilton, A.J. & Maizels, R.M. (1992a). *Toxocara canis* monoclonal antibodies to carbohydrate epitopes of secreted (TES) antigens localize to diferent secretion-related structures in infective larvae. *Exp. Parasitol.*, 75: 56-71.

- Page, A.P.; Rudin, W.; Fluri, E.; Blaxter, M.L. & Maizels, R.M. (1992b). *Toxocara canis*: A labile antigenic surface coat overlying the epicuticle of infective larvae. *Exp. Parasitol.* 75: 72-86.
- Page, A.P.; Rudin, W. & Maizels, R.M. (1992c). Lectin binding to secretory structures, the cuticle and the surface coat of *Toxocara canis* infective larvae. *Parasitol.*, 105: 285-296.
- Pangui, L.J. & Kaboret, Y. (1993). Les helminthes du chien a Dakar, Senegal. *Rev. Med. Vet.* 144 (10): 791-794.
- Parsons, J.C.; Bowman, D.D. & Grive, R.B. (1986). Tissue localization of excretory-Secretory antigens of larval *Toxocara canis* in acute and chronic murine toxocariasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35 (5). 974-981.
- Parsons, J.C.; Bowman, D.D. & Grive, R.B. (1989). Pathological and hematological responses of cats experimentally infected with *Toxocara canis* larvae. *Int. J. Parasitol.*, 19. 479-478.
- Parsons, J.C.; Coffman, R.L. & Grieve R.B. (1993). Antibody to interleukin 5 prevents blood and tissue eosinophilia but not liver trapping in murine larval toxocariasis. *Parasit. Immunol.*, 15: 501-508.
- Parsons, J.C. & Grieve, R.V. (1990a). Effect of egg dosage and host genotype on liver trapping in murine larval toxocariasis. *J. Parasitol.* 76 (1): 53-58.
- Parsons, J.C. & Grieve, R.V. (1990b). Kinetics the liver trapping of infective larvae in murine larval toxocariasis. *J. Parasitol.* 76: 519-536.
- Patiño, B.M.C. y Cruz R., A. (1992). Prevalencia de huevos de *Toxocara canis* (WERNER, 1782) en parques públicos de la ciudad de México. X Congreso Nacional de Parasitología (memorias). Cuernavaca, Mor..
- Penagos, V.; Quiroz, R.H. y Cruz, M.I. (1992). Frecuencia de parásitos entéricos en perros procedentes de la liga defensora de animales, D.F.. II Congreso nacional de parasitología veterinaria (memorias). Veracruz, Ver.. 55.
- Phillips, S.M.; Diconza, J.J.; Gold, J.A. & Reid, W.A. (1977). Schistosomiasis in the congenitally athymic (nude) mouse. I. Thymic dependency of eosinophilia, granuloma formation and host morbidity. *J. immunol.*, 118: 594-600.
- Pollard, Z.F.; Jarrett, N.H. & Hagler, W.S. (1979). ELISA for diagnosis of ocular toxocariasis. *Ophthalmology*, 86: 743-749.
- Portus, M.; Riera, C. & Prats, G. (1989). A serological survey of toxocariasis in patients and healthy donors in Barcelona (Spain). *Eur. J. Epidemiol.* 5 (2): 224-226.
- Preissshofen, L. & Lamina, J. (1977). Larva migrans visceralis infektionen in der Bundesrepublik durch *Toxocara* serologische untersuchungen. *MMW. Munch Med. Wochenschr.* 1471-1474.
- Quiroz, R.H.: Parasitología y Enfermedades parasitarias de los animales domésticos. LIMUSA. Mexico, 1988.
- Rai, S.K.; Uga, S.; Ono, K.; Nakanishi, M.; Shrestha, H.G. & Matsumura, T. (1996). Seroepidemiological study of *Toxocara* infección in Nepal. *South. Asi. J. Trop. Med. Pub. Heal.*, 27 (2): 286-290.
- Richards, D.T.; Harris, S. & Lewis, J.W. (1995). Epidemiological studies on intestinal helminth parasites of rural and urban red foxes (*Vulpes vulpes*) in the United Kingdom. *Vet. Parasitol.* 59 (1): 39-51.
- Ridley, R.K.; Dryden, M.W.; Gabbert, N.K. & Schoning, P. (1994). Epidemiology and control of helminth parasites in greyhound breeding farms. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet* 16 (5): 592-594.

- Robbins, S.L (1975): Patología estructural y funcional. Ed. Interamericana, México D.F.
- Robertson, B.D.; Bianco, A.T.; Mckerrow J.H. & Maizels, R.M. (1989). *Toxocara canis*: proteolytic enzymes secreted by the infective larvae *in vitro*. *Exp. Parasitol.*, 69: 30-36.
- Robinson, R.D.; Thompson, D.L. & Lindo, J.F.(1989). A survey of intestinal helminths of well cared for dogs in Jamaica, and their potential public health significance. *J. Helminthol.* 63(1): 32-38.
- Ruitenber, E.J.; Elgersma, A.; Kruizinga, W.; & Leenstra, F. (1977). *Trichinella spiralis* infection in congenitally athymic (nude) mice. Parasitological, serological and haematological studies with observations on intestinal pathology. *Immunol.*, 33: 581-585.
- Saeki, H.; Masu, H.; Yokoi, H. & Yamamoto, M. (1997). Long-term survey on intestinal nematode and cestode infections in stray puppies Ibanaki Prefecture. *J. Vet. Med. Sci.* 59(8): 725-726.
- Saleh, F.C.; Kirkpatrick, C.E.; De-Haseth, O. & Lok, J.B. (1988). Occurrence of some blood and intestinal parasites in dogs in Curacao, Netherlands Antilles. *Trop. Geogr Med...* 40 (4): 318-321.
- Salina, T.M.R. (1995). Análisis longitudinal de los tres antígenos de *Trichinella spiralis*. Tesis doctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.
- Schalm, O.W. (1975). *Veterinary Haematology*, 3th. ed., Lea & Febiger, Philadelphia.
- Schantz, M.P. & Glickman, L.T. (1978). *Toxocara* visceral larva migrans. *New Engl. J. Med.* 298: 436-438.
- Schantz, M.P.; Meyer, D. & Glickman, L.T. (1979). Clinical, serologic, and epidemiologic characteristics of ocular toxocariasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 28(1): 24-28.
- Schochet, S.S. (1967). Human *Toxocara canis* encephalopathy in a case of *visceral larva migrans*. *Neurology*, 17: 227-229.
- Seah, S.K.; Hucal, G. & Law, C. (1975). Dogs and intestinal parasites: a public health problem. *Can. Med. Assoc. J.* 112 (10): 1191-1194.
- Sell, S. (1996). *Immunology, Immunopathology & Immunity*. Ed. APPLETON AND LANGE. Stamford, Connecticut, USA.
- Shofer, F.S.; Glickman, L.T. & Marmor, M. (1985). Zoonotic dog roundworm (*Toxocara canis*) infection of children. Epidemiologic and neuropsychologic findings. *Am. J. Epidemiol.* 122: 515-516.
- Shields, E.S. (1984). Ocular toxocariasis. A review. *Sury. Ophthalmol.*, 28: 362-379.
- Shimizu, T. (1993). Prevalence of *Toxocara* eggs in sandpits in Tokushima city and its outskirts. *J. Vet. Med. Sci.* 55(5): 807-811.
- Shrant, M.P. (1964). Visceral larva migrans, *Toxocara canis* infection. *Lancet.* 1: 1357-1359.
- Skirnisson, K.; Eydal, M.; Gunnarsson, E. & Hersteinsson, P. (1993). Parasites of the arctic fox (*Alopex lagopus*) in Iceland. *J. Wildl. Dis.* 29 (3): 440-446.
- Small, K.W.; McCuen, B.W.; De Juan, E. & Machermer, R. (1989). Surgical management of retinal traction caused by toxocariasis. *Am. J. Ophthalmol.*, 108: 10-14.
- Smith, P.H. & Greer, C.H. (1971). Unusual presentation of ocular *Toxocara* infestation. *Brit. J. Ophthal.*, 55: 317-320.

- Smith, H.V.; Quinn, R.; Bruce, R.G. & Girdwood, R.W. (1982). Development of the serological response in rabbits infected with *Toxocara canis* and *Toxascaris leonina*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 67 (1): 89-94.
- Soltys, J.; Boroskova, Z.; Dublinsky, P.; Tomasovicova, O.; Auer, H. & Aspöck, H. (1996). Effect of glucan immunomodulator on the immune response and larval burdens in mice with experimental toxocarosis. *Appl. Parasitol.* 37 (3): 161-167.
- Sommer, C.; Ringelstein, E.B.; Biniek, R. & Glockner, W.M. (1994). Adult *Toxocara canis* encephalitis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 57(2): 229-231.
- Sommerfelt, I.; Degregorio, O.; Barrera, M y Gallo, G. (1992). Presencia de huevos de *Toxocara canis* de la ciudad de Buenos Aires, Argentina. 1989-1990. *Rev. Med. Vet. Bue. Air.* 73 (2): 70-74.
- Sorr, E.M. (1984): Meandering ocular toxocariasis. *Retina*, 4:90-96.
- Soulsby E.J.L.: *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals*. Lea & Febiger, USA. (1982).
- Speiser, F. & Gottstein, B. (1984). A collaborative study on larval secretory-excretory antigens of *Toxocara canis* for the immunodiagnosis of human toxocariasis with ELISA. *Acta Trop.* 41: 361-372.
- Speiser, F. & Weiss, N. (1979). Comparative evaluation of 7 helminth antigens in the enzyme-linked immunosorbent assay (E.L.I.S.A.). *Experientia*, 35 (11): 1512-1514.
- Sprent, J.P. (1958). Observations on the development of *Toxocara canis* (Werner, 1782) in the dog. *Parasitol.* 48: 184-209.
- Stehr-Green, J.K.; Murray, G.; Schantz, P.M. & Wahlquist, S.P. (1987). Intestinal parasites in pet store puppies in Atlanta. *Am. J. Public. Health.* 77 (3): 345-346.
- Stevenson, P. & Jacobs, D.E. (1977). *Toxocara* infection in pigs. The use of indirect fluorescent antibody tests and an in vitro larval precipitate test for detecting specific antibodies. *J. Parasitol.* 51 (2): 149-154.
- Sturchler, D.; Bruppacher, R. & Speiser, F. (1986). Epidemiological aspects of toxocariasis in Switzerland. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 116 (33): 1088-1093
- Sugane, K. & Oshima, T. (1982). Eosinophilia, granuloma formation and migratory behaviour of larvae in the congenitally athymic mouse infected with *Toxocara canis*. *Parasit. Immunol.* 4; 307-318.
- Sugane, K. & Oshima, T. (1983). Trapping of large numbers of larvae in the livers of *Toxocara canis* reinfected mice. *J. Helminthol.* 57 (2): 95-99.
- Sugane, K. & Oshima, T. (1983b). Purification and characterization of excretory-secretory antigen of the *Toxocara canis* larvae. *Immunol.* 50: 113-118.
- Sugane, K. And Oshima, T. (1984). Introduction of peripheral blood eosinophilia in mice by excretory and secretory antigen of *Toxocara canis*. *J. Helminthol.* 58(2): 143-147.
- Takamoto, M.; Kusama, Y.; Takatsu, K.; Nairuchi, H. & Sugane, K. (1995). Occurrence of interleukin 5 production by CD4- CD8- (double negative) T cells in lung of both normal and congenitally athymic nude mice infected with *Toxocara canis*. *Immunol.* 85: 285-291.
- Takamoto, M.; Ovington, K.S.; Behm, C.A.; Sugane, K.; Young, I.G.; Matthaei, K.(1997). Eosinophilia, parasite burden and lung damage in *Toxocara canis* infection in C57Bl/6 mice genetically deficient in IL-5. *Immunol.* 90 (4): 511-517.

- Takamoto, M. & Sugane, K. (1993). Mechanisms of eosinophilia in *Toxocara canis* infected mice: *In vitro* production of interleukin 5 lung cells of both normal and congenitally athymic nude mice. *Parasit. Immunol.*, 15:493-500.
- Tanaka, J. & Torisu, M. (1978). *Anisakis* and eosinophil. I. Detection of a soluble factor selectively chemotactic for eosinophils in the extract from *Anisakis* larvae. *J. Immunol.*, 120: 745-749.
- Tanaka, J.; Baba, T. & Torisu, M. (1979). *Ascaris* and eosinophil. II. Isolation and characterization of eosinophil chemotactic factor and neutrophil factor of the parasite in *Ascaris* antigen. *J. Immunol.*, 122: 302-308.
- Tarish, J.H.; Al-Saqr, I.M.; Al-Abbassy, S.N. & Kadhim, F.S. (1986). The prevalence of parasitic helminths in stray dogs in the Baghdad area, Iraq. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 80(3): 329-331.
- Toledo-Seco, C.I.; de-Armas-Hernández, F.; del-Castillo-Remiro, A.; Arevalo-Morales, P.; Pinero-Barroso, J.E. y Valladares-Hernández, B. (1994). La contaminación parasitaria de parques y jardines como problema de salud pública. Datos de la isla de Tenerife. *Rev. Sanid. Hig. Pública Madr.* 68 (5-6): 617-622.
- Tonimura, T.; Yokota, M. & Takiguchi, M. (1976). Experimental visceral larva migrans in monkey 1. Clinical, hematological, biochemical and gross pathological observations on monkeys inoculated with embryonated eggs of the dog ascarid, *Toxocara canis*. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 38: 533-544.
- Turner, T. & Pegg, E. (1977). A survey of patent nematode infestations in dogs. *Vet. Rec.* 100 (14): 284-285.
- Uga, S. and Kataoka, N. (1993). Measures to control *Toxocara* egg contamination in sandpits of public park. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52 (1): 21-24.
- Umeche, N. (1989). Helminth ova in soil from children's playgrounds in Calabar, Nigeria.
- Uga, S.; Minami, T. and Nagata, K. (1996). Defecation habits of cat and dog and contamination by *Toxocara* eggs in public park sandpits. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54(2):122-126.
- Ugochukwu, E.I. & Ejimadu, K.N. (1985). Studies on the prevalence of gastro-intestinal helminths of dogs in Calabar, Nigeria. *Int. J. Zoonoses.* 12 (3): 214-218.
- Valdivia, F.; Gutierrez, G.J.J. y Vargas, I.F.J. (1983). Estudio sobre prevalencia de parásitos gastrointestinales en perros caseros del estado de aguascalientes. IV Reunión anual de la asociación mexicana de parasitología veterinaria (memorias). México, D.F.. 33.
- Valkounova, J. (1982). Parasitological investigation of children's sand boxes and dog faeces from public areas in old housing districts of Prague. *Folia Parasitol. Praha.* 29 (1): 25-32.
- Valladares, B.; Gijón, H. y López-Román, R. (1985). Estudio epidemiológico del parasitismo intestinal del perro (*Canis familiaris*) en la isla de Tenerife. *Rev. Ibér. Parasitol.* 48 (1): 41-48.
- Vanparijs, O; Hermans, L. & Van-der-Flaes, L. (1991). Helminth and protozoan parasites in dogs and cats in Belgium. *Vet. Parasitol.* 38 (1): 67-73.
- Vazquez-Valdez, F.; Gonzalez-López, A.; Gutierrez-Gonzalez, M.J.; Fernandez-Martínez, A. y Llanea-Llaneza, J.J. (1989). Parasitosis intestinal en el población canina del Principado de Asturias. *Rev. Sanid. Hig. Pública Madr.* 65 (5): 49-61.

- Vega, A.N. y Rivera, F.N. (1996). Presencia de *Toxocara canis* en cachorros de las razas Beagle y Pug, en México, D.F. mediante técnicas coproparasitoscópicas. XII Congreso nacional de parasitología (memorias). Aguascalientes, Ags.. 91.
- Venturini, L. y Radman, N.E. (1988). Frecuencia de *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum* y *Giardia* spp. según el sexo y la edad, en caninos de La Plata (Bs. As., Argentina). *Rev. Vet. Vet. Bue. Air.* 69 (3): 161-165.
- Verster, A. (1979). Gastro-intestinal helminths of domestic dogs in the republic of South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 46 (2): 79-82.
- Viens, P.; Strykowski, H.; Richards, R. & Sonea, S. (1975). A modified immunofluorescent antibody technique for the serodiagnosis of human toxocaral larva migrans. *Can. J. pUbl. Health.*, 66 (3): 237-240.
- Virginia, P.; Nagakura, K.; Ferreira, O. & Tateno, S. (1991). Serologic evidence of toxocariasis in northeast Brazil. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 44 (1): 1 -6.
- Vortel, V.; Pavelka, I.; Uhlikowa, M.; Hubner, J. & Zezulka, B. (1983). Larval toxocariasis in a 40 year old man with tedección of larvae in a liver biopsy. *Cesk Patol.* 19 (4): 193-198.
- Wachira, T.M.; Sattran, M.; Zeyhle, E. and Njenga, M.K. (1993). Intestinal helminths of public health importance in dogs in Nairobi. *East. Afr. Med. J.* 70 (10): 303-307
- Wang, M.Q.; Jiang, H.J.; Inohue, H., Myozaki, M. & Yamashita, U. (1995). B cel mitogenic activity of *Toxocara canis* adult worm antigen. *Parasit. Immunol.*, 17: 609-615.
- Warren, K.S. and Mahmoud, A.A.F. (1977). Algorithms in the diagnosis and management to exotic diseases. *J. Infect. Dis.* 55: 99-109.
- Watzke, R.C.; Oaks, J.A. & Folk, J.C. (1984). *Toxocara canis* infection of the eye. Correlation of clinical observations with developing pathology in the primate model. *Arch. Ophthalmol.* 102 (2): 282-291.
- Wilder, H.C. (1950). Nematode endophthalmitis. *Trans. Am. Acad. Ophthalmol.* 55:99-109.
- Woodliff, H.J. & Herrmann, R.O. (1981). Hematología clínica. Ed. Manual Moderno, S.A., México D.F..
- Woodruff, A.W.; Bisseru, B. and Bowe, J.C. (1966). Infection with animal helminths as a factor in causing poliomyelitis and epilepsy. *Br. Med. J.*, 1: 1576.1579.
- Worley, G.; Green, J.A.; Frothingham, T.E.; Sturner, R.A.; Walls, K.W. Pakalnis, V.A. & Ellis, G.S. (1984). *Toxocara canis* infection: clinical an epidemiological associations with seropositivity in Kindergarten chidren. *J. Infect. Dis.* 149 (4): 591-597.
- Worley, R.C.; Oaks, J.A. & Folk, J.C. (1984). *Toxocara canis* infection of the eye. Correlation of clinical observations with developing pathology in the primate model. *Arch. Ophtholmol.* 102 (2): 282-291.
- Yamaguchi, Y.; Matsui, T; Kasahara, T.; et. al. (1990). In vivo changes of hemopoietic progenitors and the expression of the interleukin-5 gene in eosinophilic mice infected with *Toxocara canis*. *Exp. Hematol.*, 118: 1152-1157.
- Yamashita, U.; Jiang, H.G.; Inohue, H.; Mutoh, Y. & Fujita.H. (1993). Immune funtions of *Toxocara canis*-infection. *Jpn. J. Parasitol.*, 42: 211-219.
- Zerneflo, S.L.M.; Villagómez, C.J.A. y Lohmann, R.L.D. (1989). Variables epidemiológicas asociadas a la presencia de helmintos gastroentéricos en perros de la ciudad de Veracruz, Ver., México. I Congreso nacional de parasitología veterinaria (memorias). Aguascalientes, Ags.. 51.

Zeybek, H.; Tatar, N. and Tokay, A. (1992). Parasites and their prevalence in rural dogs in the Ankara region. *Etilik Vet. Mikrobiyol. Dergisi* 7 (2): 17-27.

Zygulska.March, H.; Krukar-Baster, K. And Ziobrowski, S. (1993). Ocular toxocariasis in children and youth. *Doc. Ophthalmol.*, 84(2): 145-154.

Zyngier, F.R. & Brockbank, A. (1974). Electron microscopy of the lung in experimental *Toxocara canis* infection. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 68 (2): 229-233.