

00322

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto del extracto del fruto de *Bromelia pinguin* sobre la cutícula
de *Toxocara canis*, estudio *in vitro*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

Perla María del Carmen/Acevedo Ramírez



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTOR DE ESTUDIOS DE TESIS MARTÍN PONCE MACOTELA



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.

PAGINACION DISCONTINUA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
"Efecto del extracto del fruto de Bromelia pinguin sobre la cutícula de
Toxocara canis, estudio in vitro".

realizado por ACEVEDO RAMIREZ PERLA MARIA DEL CARMEN

con número de cuenta 09510974-7 , quien cubrió los créditos de la carrera de:

BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

A t e n t a m e n t e

Director de Tesis
Propietario

DRA. MARTHA PONCE MACOTELA *[Firma]*

Propietario

BIOL. MARIO NOE MARTINEZ GORDILLO *[Firma]*

Propietario

M. en C. ANGELICA GONZALEZ MACIEL *[Firma]*

Suplente

M. en C. MARIA BERENIT MENDOZA GARFIAS #13

Suplente

DR. GUILLERMO SALGADO MALDONADO *[Firma]*

Consejo Departamental de BIOLOGIA

[Firma]
M. en C. JUAN MANUEL RODRIGUEZ CHAVEZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGIA

2

Agradecimientos

A mi Mamá :

Por tu apoyo incondicional en todos los aspectos, tu confianza y comprensión que me has dado siempre que la necesito, GRACIAS, por que sin ti no lo hubiera logrado.

A mi Papá :

Por tu apoyo y por ayudarme a demostrar que puedo lograr lo que quiero.

A LOS DOS Gracias por su paciencia.

A David y Fabián :

Por alentarme y permitirme ser parte de ustedes. Espero no ser un mal ejemplo.

A la Familia Cuevas De León :

Que siempre ha sido mi segunda familia, me han dado su apoyo, amistad y siempre están cuando las necesito, en especial a Rosa, Tere, Ana y Felipe Aldana.

A todos mis tíos, tías y primas (os) :

Que siempre me han animado para seguir adelante.

Yuli, gracias por tu ayuda.

A mi Pueblo-Senda-Universum :

Sofía, Gabby, Isabel, Liliana, Lidia, Katy, Maribel, Noé, Leonardo y Roberto Sanginés que me han regalado dos de los mejores años de mi vida y espero que sean más. Los quiero mucho.

A Gus :

Por tu alegría, cariño y optimismo.

A mis compañeros :

Fer, Irais, Miguel, Laura y Angélica.

*A todos los que hicieron posible la creación de esta tesis Mil gracias a la Dra. Martha Ponce, al Biól. Mario Martínez, a la M. en C. Angélica González, al QPB Francisco López, al MVZ Enrique Soto, al Biól. Ignacio De la Mora, a la Biól. Yadira Rufino, y todos los que me permitieron trabajar y aprender de ellos.
Gracias a la M. en C. María Berenit Mendoza y al Dr. Guillermo Salgado por aceptar ser revisores y hacerme observaciones muy acertadas.*

A Carlos A, Isaiás M, Jorge D y Ricardo C. Del Dpto. de Informática,

Al Instituto Nacional de Pediatría

y a la Universidad Nacional Autónoma de México.

A

Dedicatoria :

A mis Padres y a mis Hermanos:

*Este trabajo es de todos ya que sin ustedes que son los que más quiero
no habría sido posible.*

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto del extracto del fruto de *Bromelia pinguin* sobre la
cutícula de *Toxocara canis*, estudio *in vitro*.**

PERLA MARÍA DEL CARMEN ACEVEDO RAMÍREZ

DIRECTORA
DRA. MARTHA PONCE MACOTELA

6

INDICE

Introducción	3
Capítulo I <i>Toxocara canis</i>	
Generalidades de nemátodos	5
Taxonomía de <i>T. canis</i>	11
Morfología	11
Ciclo de vida	12
Toxocarosis	14
Tratamiento	14
Larva Migrans Visceral y Ocular	15
Epidemiología	15
Tratamiento	16
Capítulo II <i>Bromelia pinguin</i>	
Descripción botánica	17
Distribución geográfica	18
Historia	18
Enzimas	19
Capítulo III	
Justificación	20
Objetivos	20
Hipótesis	20
Capítulo IV	
Material y Método	21
Capítulo V	
Resultados	24
Capítulo VI	
Discusión	46
Conclusión	49
Anexo	50
Referencias	52

INTRODUCCION

Toxocara canis es un nemátodo parásito del orden Ascaridata, cuyos hospederos definitivos son los cánidos. La Toxocarosis es común en perros domésticos, la prevalencia en cachorros de dos a seis meses de edad alcanza un porcentaje arriba del 98% (Bogitsh and Cheng, 1998) y menor al 20% para adultos (Schantz and Glickman, 1978). En México la frecuencia encontrada fue del 75% y 7.1% respectivamente (Vázquez et al, 2001).

Los datos anteriores sugieren que la contaminación del suelo con huevos de este parásito es elevada y por tanto constituye un problema de salud pública ya que el humano puede infectarse accidentalmente al ingerirlos o inhalarlos. De estos huevos se libera la larva que migra por varios órganos causando el síndrome de larva migrans visceral (LMV) o larva migrans ocular (LMO).

Se estima que de 10,000 infecciones solo se detectan tres (Toxocarosis, 2002). En un estudio serológico realizado en México a niños de entre 6 y 13 años de edad se observó que el 7.5% resultó positivo a *T. canis* (Martínez et al, 1997).

La larva migrans visceral (LMV) o larva migrans ocular (LMO) se presenta con mayor frecuencia en niños que tienen contacto con perros parasitados o que juegan con tierra. En algunas ocasiones la presencia de la larva pasa inadvertida ya que no muestra signos ni síntomas o puede ser confundida con otros parásitos lo cual dificulta su tratamiento.

Para el tratamiento de las perras preñadas se ha utilizado el febendazol y fluobendazol en dosis de 50mg/kg diariamente con un alto porcentaje de efectividad (Lamothe y García, 1988). Para los cachorros se ha utilizado la piperazina y el pamoato de pirantel (Barriga, 1991). La piperazina hiperpolariza la membrana muscular y reduce la producción de ácido succínico necesario para la vida de estos parásitos. El pamoato de pirantel produce parálisis espástica e inhibe a las colinesterasas. Este fármaco se absorbe deficientemente por el tracto intestinal lo cual contribuye a su acción selectiva sobre nemátodos gastrointestinales. El tratamiento para pacientes con LMV o LMO es el albendazol o la dietilcarbamacina (García, 2001). Sin embargo, los fármacos no son totalmente efectivos por lo que se han presentado cepas de nemátodos resistentes a éstos.

Con base en lo descrito es necesario buscar tratamientos alternativos como los que ofrecen algunas plantas con propiedades terapéuticas de origen natural y baja toxicidad para los animales y el humano, como son las especies de la familia Bromeliacea entre ellas la *Annona senegalensis* que es usada como antiparasitante (Alawa et al, 2003) y la *Bromelia*

pinguin, conocida comúnmente como maya, piñuela, piña de ratón, cardo y guámara, entre otros nombres (Martínez, 1994). Desde tiempos inmemoriales las piñuelas (*B. pinguin*) se usaron como plantas medicinales para controlar los dolores menstruales, como abortivo, antiescorbútico, diurético y antihelmíntico (Martínez y Fragoso, 1969), antigotoso e hipocolesterolemiante.

En estudios realizados en especies de la familia Bromellaceae se han encontrado enzimas que usan como sitio activo un grupo SH para la degradación de proteínas. Del jugo de los frutos de *B. pinguin* se extrajo la pinguinalina, que es muy parecida a la bromelina y a la papaína obtenidas de la piña y de la papaya respectivamente, estas últimas son usadas como desparasitantes debido a que provocan la destrucción y expulsión de parásitos intestinales. La pinguinalina muestra efectos antidiabéticos y anti-inflamatorios y actúa en la destrucción de coágulos (López, 1984).

En este trabajo se estudió el efecto *in vitro* del jugo de *B. pinguin* sobre la cutícula de la fase adulta de *Toxocara canis*, parásito que se obtuvo del intestino delgado de cachorros sacrificados en el Centro de Control Canino "Culhuacan".

GENERALIDADES DE NEMÁTODOS

Los nemátodos son gusanos cilíndricos, alargados, con cuerpo no segmentado. La cavidad corporal o pseudoceloma contiene un fluido en el que se encuentra el aparato reproductor y digestivo. El cuerpo está formado por un tubo externo que es la pared corporal y encierra al tracto digestivo (Fig. 1).

Son dioicos, presentan dimorfismo sexual ya que el extremo posterior de los machos está curvado ventralmente y ornamentado con alas y papilas. Generalmente los machos son de menor tamaño que las hembras.

Los órganos de los sentidos que poseen sirven como receptores táctiles, quimiorreceptores (anfídios y los fasmídeos), mecanorreceptores (papilas labiales y cefálicas) y fotorreceptores solo en especies de vida libre (Cheng, 1978).

La pared corporal está formada por tres capas: cutícula, hipodermis y la capa más interior de células musculares (Wright, 1987).

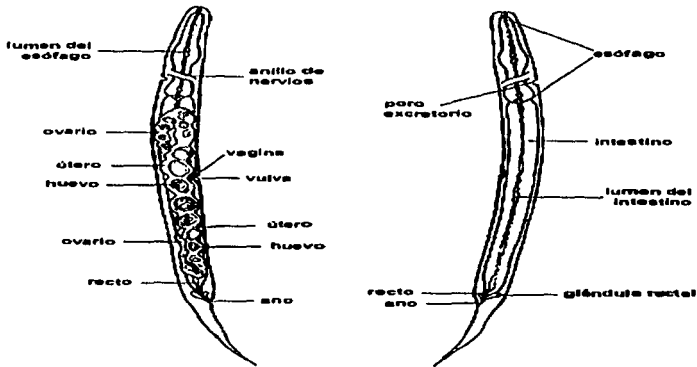


Fig. 1. Esquema de la morfología de una hembra en donde se aprecia el aparato reproductor y el digestivo.

Cutícula.

La cutícula es una cubierta externa gruesa y estratificada compuesta por colágena; protege y mantiene la alta presión hidrostática del pseudococele, de la cavidad bucal, esófago, poro excretor, vagina, cloaca y recto. Puede ser lisa o puede tener estrías longitudinales y circulares que en algunos sitios se modifica formando vesículas, alas y papilas (Lapage, 1981).

La cutícula es resultado de la transformación de proteínas complejas como la colágena, su corteza está compuesta por esta proteína con presencia de una polifenol oxidasa, ordenadas en una capa cortical interna y otra externa (Cheng, 1978).

La capa matriz se compone por una capa fibrilar con canales ramificados que se dirigen a la capa cortical externa, el lumen de estos canales está relleno de una sustancia rica en aminoácidos aromáticos. Contiene una capa homogénea compuesta por proteínas albuminoideas y de proteínas fibrosas similares a la elastina y fibrina además de contener carbohidratos y algunos lípidos.

La capa fibrosa está formada por tres capas: externa, media e interna, constituidas por fibras colágenas y una lámina basal que separa a la cutícula de los tejidos subyacentes.

La cutícula es resistente a las enzimas digestivas del hospedero; mantiene la forma y estructura de los nemátodos y sirve para anclar los músculos. Las capas están arregladas de manera que permiten mantener un diámetro corporal constante de los gusanos y al mismo tiempo les permite estirarse longitudinalmente. Esta estructura no es inerte, tiene un metabolismo activo ya que presenta aminoácidos, proteínas carbohidratos, lípidos, ARN, ácido ascórbico, Trifosfato de adenosina (ATP) y hemoglobina lo que indica que éste puede ser un segundo sitio para la síntesis de proteínas cuticulares. Por otra parte, es antigénica y es muy importante para iniciar una respuesta inmunológica en el hospedero (Colin, 2000).

La cutícula limita la entrada al cuerpo de moléculas grandes pero permite el paso libre del agua y de lípidos, de compuestos polares y no polares, sales (iones) y glucosa (Wright, 1987).

Hipodermis

Se encuentra bajo la lámina basal y puede ser sincicial o celular, posee gran cantidad de glucógeno y grasas. En ella se localiza una capa muscular gruesa; la musculatura de la pared del cuerpo se fija a la cutícula mediante fibras que se originan en la porción contráctil de la célula muscular, atraviesan la lámina basal y se fijan a la capa fibrosa. Presenta cuatro cordones que recorren longitudinalmente el cuerpo:

- Dos cordones nerviosos: uno ventral y uno dorsal.
 - Dos laterales, en los cuales se localizan en los conductos excretores
- Después de la hipodermis se localiza la membrana basal y más internamente se encuentra la capa muscular.

Capa muscular.

Por debajo de la hipodermis se sitúan una o más capas de músculo estriado (somático) ordenadas longitudinalmente. Los músculos están dispuestos en cuatro bandas o cuadrantes, marcados por los cuatro cordones epidérmicos. Cada célula posee una parte contráctil con fibras musculares y una no contráctil o cuerpo celular que contiene organelos, glucógeno y lípidos. Las células están asociadas con la hipodermis y conectan a la cutícula mediante fibras que pasan por la parte contráctil. El músculo no está innervado, pero las células tienen prominencias que las encadenan a los troncos nerviosos (Chester, 2003).

Aparato digestivo

El aparato digestivo es completo. La boca se localiza en el extremo anterior del cuerpo, está delimitada por seis labios a veces reducidos a tres en los que portan a los órganos de los sentidos, se abre dentro de la cápsula bucal que se comunica con el esófago irrradiado rodeado por una capa muscular espesa (Brusca and Brusca, 1990). En el esófago hay un ventrículo posterior sin divertículo ventricular ni ciego intestinal. El esófago se continúa con el intestino que a su vez se comunica con el recto y desemboca en el ano en la zona ventral de la parte posterior del cuerpo. La circulación de los nutrientes se realiza por los movimientos del cuerpo y la locomoción debido a que no hay sistema vascular (Fig. 3).

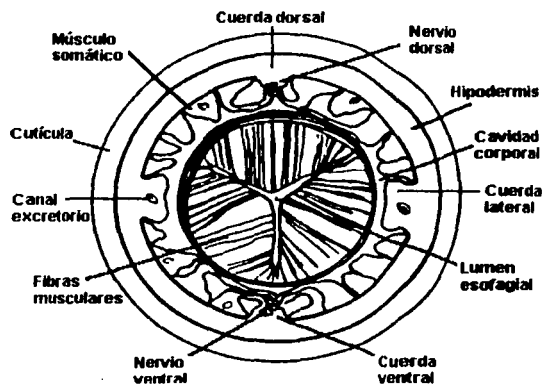


Fig. 3 Esquema que muestra un corte transversal de la región anterior.

Aparato excretor

Los nemátodos poseen una o dos células renales caracterizadas por ser grandes células glandulares que se comunican al exterior a través del poro excretor situado anteriormente a la altura del anillo circunfosofágico. En ocasiones las células se unen formando una estructura con forma de H (Cheng, 1978).

Sistema nervioso

El sistema nervioso está formado por cordones longitudinales (uno dorsal, uno ventral y cuatro laterales) con comisuras transversas, de éstas la más importante es el anillo circunfosofágico que representa el centro nervioso. Los órganos importantes, los integumentos y las papilas sensoriales están inervados (Chester, 2003). Entre los órganos de los sentidos están los quimiorreceptores: anfidios (excavaciones laterales localizadas en el extremo anterior) y fasmidios (pequeñas bolsas receptoras, laterales y posteriores) y mecanorreceptores: papilas labiales y cefálicas (Brusca and Brusca, 1990).

Sistema reproductor

Los nemátodos son generalmente dióicos. Los machos son más pequeños que las hembras, su extremo posterior es curvado y presenta papilas caudales. Presentan un testículo tubular, el vaso deferente es una continuación del extremo posterior del testículo que se dirige posteriormente y antes de terminar se ensancha formando la vesícula seminal que se comunica con el recto mediante un conducto eyaculador muscular para desembocar en la cloaca. Poseen espículas copulatrices además de que en algunas especies los machos presentan un gubernáculo endurecido.

Las hembras tienen dos ovarios (didélficas) que se extienden en direcciones opuestas. Los ovarios son tubos derechos, enroscados o muy plegados (Schmidt, 1983). Del extremo proximal de cada ovario surge un oviducto que se ensancha formando el receptáculo seminal que une al oviducto con el útero tubular. Los dos úteros, se unen en la zona próxima al gonoporo para formar la vagina. El gonoporo se localiza en la línea media ventral del tercio medio del cuerpo. La vulva se localiza entre la quinta y la sexta porción del cuerpo desde el extremo anterior.

La fecundación cruzada es la más frecuente aunque algunas especies de vida libre son hermafroditas protándricas y otras se reproducen por partenogénesis o autofecundación.

Los huevos están envueltos por tres capas, la primera es la membrana de fertilización que se forma cuando el espermatozoide penetra en el óvulo, esta cubierta aumenta su espesor hasta que se forma una capa quitinosa, en seguida el cigoto segrega la membrana vitelina dentro de la cáscara que está compuesta por glucósidos y con solubilidad parecida a los lípidos. Por último, la capa proteica y rugosa externa se segrega cuando el huevo atraviesa el útero (Schmidt, 1983).

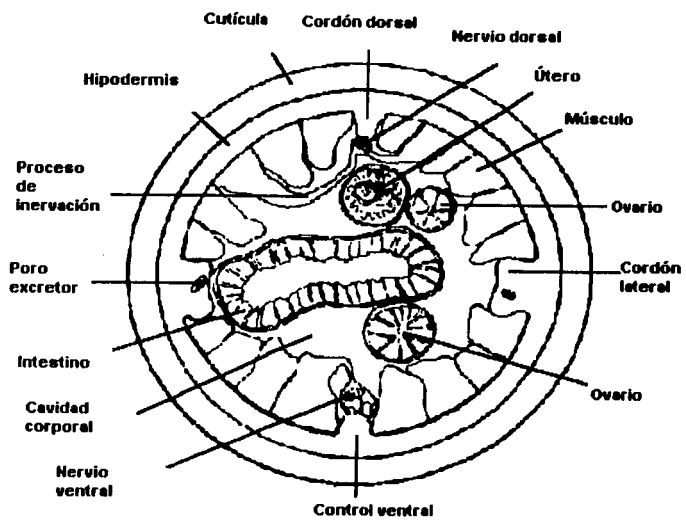


Fig. 4 Esquema de un corte transversal de la región media.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Toxocara canis

Taxonomía

Reino: Animal
Phylum: Nematoda(=Nemata)
Clase: Secernentea (Phasmidia)
Orden: Ascaridata
Suborden: Ascaradina
Superfamilia: Ascaridoidea
Familia: Toxocaridae
Género: *Toxocara*
Especie: *T. canis*

Morfología de *Toxocara canis*

Toxocara canis es una especie dioica, los machos adultos miden hasta 10 x 0,3 cm y las hembras 18 X 0,5 cm, son de color blanco amarillento y rosado. La región caudal del macho está reducida en diámetro, presenta cinco pares de papilas en la cola cónica y 20 pares de papilas preanales, termina en curva y posee alas caudales (Lapage, 1981). En la hembra la vulva se localiza entre la quinta y sexta parte del cuerpo desde el extremo anterior y la cola termina en punta (Fig. 2). La región cefálica tiene aletas cervicales (más largas que anchas) y tres labios que tienen rebordes finos pero carecen de interlabios. (Aguirre, 1993).



Fig. 2. Hembras y machos de *Toxocara canis*

Los huevos son de color pardo y casi esféricos, miden entre 75 y 85 micrómetros, su cubierta delgada tiene depresiones superficiales llamadas mamezones. En el momento de la oviposición los huevos no están larvados, así que requieren de ciertas condiciones ambientales para alcanzar su estado infectivo (Aguirre, 1993). La morfogénesis se completa en 35 días si el huevo está expuesto a una temperatura de 16.5° C. El desarrollo se detiene si los huevos se mantienen a temperaturas inferiores a 12°C y se pueden desarrollar entre 3 y 5 días si están a 30°C. Los huevos son muy resistentes a las condiciones extremas y pueden soportar temperaturas menores a -25°C siempre que exista una pequeña cantidad de oxígeno.

Ciclo de vida

Los perros y otros cánidos silvestres son los hospederos definitivos de *Toxocara canis*. La infección ocurre cuando los cánidos ingieren huevos larvados de segundo estadio (Lamothé y García, 1988). El pH ácido del estómago y el pH alcalino del duodeno estimulan la liberación de la larva, que se ancla al intestino delgado, penetra a la pared intestinal y emigra por vía hematógica al hígado. Algunas larvas permanecen en el hígado y otras llegan a los pulmones, aquí hay dos alternativas de migración:

-Traqueal: se presenta principalmente en cachorros. Cuando las larvas llegan a pulmón, rompen la membrana alveolocapilar, llegan a bronquios, tráquea, laringe y epiglotis, se degluten y pasan a esófago, estómago e intestino delgado en donde alcanzan la madurez y se reproducen (Parsons, 1984).

-Somática: las larvas continúan su migración en la circulación y terminan en el músculo esquelético, riñones y otros órganos permaneciendo en estado hipobiótico, muy común en los perros adultos y en hospederos paraténicos. Cuando las perras están preñadas, las larvas reinician su metabolismo normal, emigran a la placenta, a los fetos, glándulas mamarias y al intestino (Barriga, 1991).

Debido a la transmisión vertical, los fetos se infectan in útero y por vía transmamaria (Lloyd, 1986). (Fig. 5).

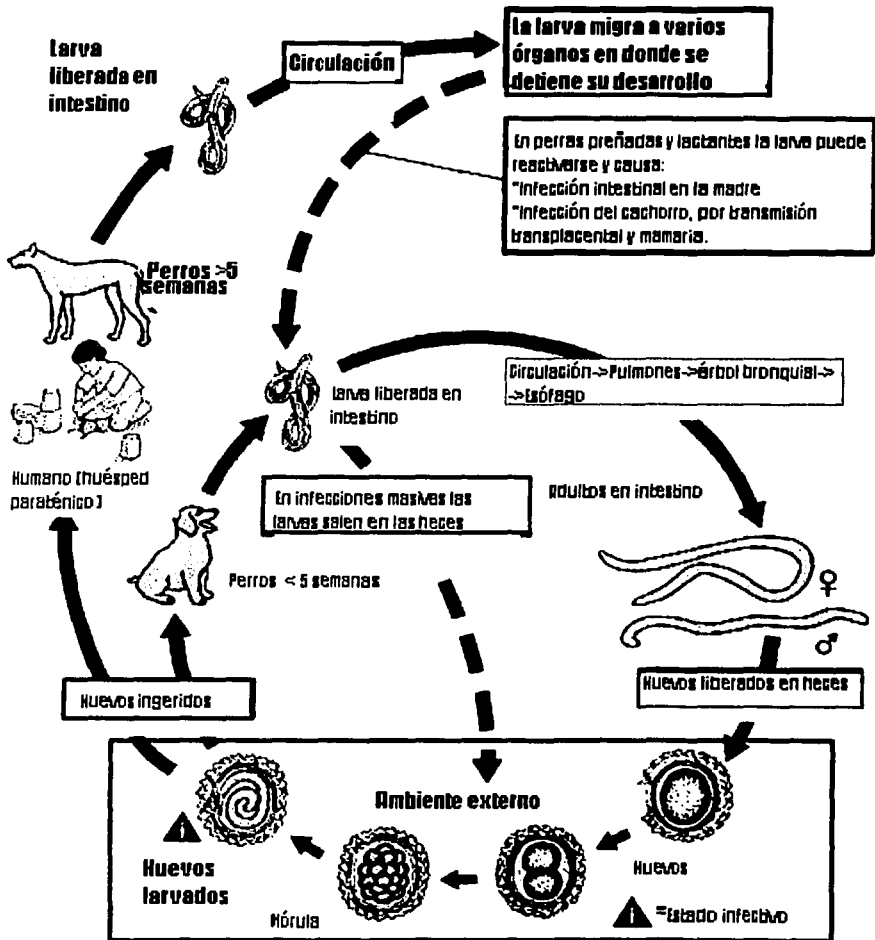


Fig. 5 Ciclo de vida de *Toxocara canis*

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Toxocariosis

La toxocariosis es una geohelminthiasis que se presenta con mayor frecuencia en perros cachorros que en adultos (Lapage, 1981). Las manifestaciones clínicas son diarrea, vómito, anemia, distensión del abdomen, tos, neumonía e incluso la muerte en infecciones masivas debido al daño producido en el tracto respiratorio y digestivo (Overgaauw, 1998).

Se calcula que entre el 98 y 100% de los cachorros son positivos a *T. canis* (Bogitsh and Cheng, 1998; Overgaauw, 1998). La frecuencia en los adultos es menor probablemente porque tienen inmunidad desarrollada a estos parásitos (Lamothe y García, 1988) ya que su frecuencia es menor al 20% (Schantz and Glickman, 1978).

En perros de la ciudad de Querétaro el 13.93% resultó positivo a *T. canis*, de los cuales, los cachorros presentaron la prevalencia más alta (Fernández y Cantó, 2002); en un estudio realizado en la ciudad de México 33.6% resultaron positivos (Martínez et al, 1998) mientras que en otro trabajo se observó una frecuencia de 75.6 % para cachorros y de 7.1% para perros mayores de seis meses (Vázquez et al, 2001).

Diagnóstico

Se basa en los signos clínicos de los cachorros con distensión abdominal marcada y condición física pobre, se confirma con pruebas coproparasitológicas para detectar la presencia de huevos e incluso gusanos liberados en las heces (Parsons, 1984).

Tratamiento

A los cachorros se les ha administrado una combinación de febantel, pirantelo embonado y praziquantel o febendazol reduciendo hasta en un 80% los huevos liberados en las heces, en tanto que la piperazina redujo el 86% de los nemátodos intestinales (Fisher, 1994). A las perras preñadas se les administra febantel o febendazol y doramectina en varias dosis dependiendo del peso corporal con efectividad elevada (Schneider, 1996). Sin embargo, se estima que bajo condiciones normales la efectividad de los fármacos se reduce entre un 40 y 50 % (Barriga, 1991).

Larva Migrans Visceral y Larva Migrans Ocular.

El humano es hospedero accidental de *Toxocara canis*, se infecta al ingerir o inhalar huevos larvados (L2) que se encuentran en el ambiente adquiriendo la larva migrans visceral y/o larva migrans ocular (Parsons, 1984). Los más afectados son niños de uno a seis años de edad que juegan con tierra y que están en contacto con perros. Debido a que el hombre no es el hospedero definitivo, el parásito no sigue el ciclo normal, cuando los huevos larvados de segundo estadio son deglutidos, llegan al duodeno en donde las larvas eclosionan, penetran la mucosa intestinal, alcanzan los vasos sanguíneos y realizan una migración errática a través de las vísceras, los ojos e incluso el sistema nervioso central.

El cuadro clínico se caracteriza por fiebre, hepatoesplenomegalía y neumonitis, puede dañar el hígado, corazón pulmones; cuando las larvas llegan a cerebro producen alteraciones neurológicas que se manifiestan con convulsiones, parálisis e incluso la muerte. En la larva migrans ocular puede haber estrabismo, leucocoria, conjuntivitis, fotofobia, lagrimeo, visión borrosa y endoftalmítis, desprendimiento de la retina, pérdida de la visión o del globo ocular (Martínez et al, 1997).

Diagnóstico

Se hace mediante exámenes serológicos (De Haro, 1995) con las pruebas inmunológicas ELISA y Microprecipitación, aunque pueden presentarse problemas de antígenos cruzados con otros parásitos.

Otra forma de establecer el diagnóstico es mediante la observación directa de las larvas en una biopsia y la presencia de signos clínicos como la eosinofilia elevada (Lamothe y García, 1988).

Epidemiología.

Se han realizado estudios epidemiológicos de este parásito en diferentes partes del mundo encontrándose distintos valores en la prevalencia de la infección, por ejemplo, se estima que en Estados Unidos se encuentran hasta 10,000 infecciones por año. En este mismo país en una muestra de 333 niños de 5 a 7 años de edad se observó que la prevalencia de seropositividad fue del 23.1% (Worley et al, 1984); en otro estudio en el cual se incluyó el suero de 4652 niños de Nueva York, se reportó una seroprevalencia del 10.8% (Marmor et al, 1987). En zonas rurales de Corea, de 314 sueros de individuos adultos sanos, 16(5%) resultaron positivos (Park, 2002). En Irán de 519 sueros de niños de 6 a 13 años, la

prevalencia total fue del 25.6%, siendo más alta en la zona urbana (30.15%) que en residentes rurales (20.2%) (Sadjjadi, 2000). En 1023 sueros de residentes de Lima, Perú, 75 (7.33%) mostraron anticuerpos anti-*T. canis* (Zevallos, 1998).

En México, de 373 sueros de niños de 6 a 13 años de edad, 28 (7.5%) resultaron positivos (Martínez et al, 1997). En otro estudio realizado con sueros de 207 niños (20 meses hasta 17 años 11 meses) con diagnóstico clínico de parásisis cerebral infantil, el 1.9% (4) fue positivo a Larva Migrans visceral (Fernández et al, 1999).

Tratamiento

En los pacientes con Larva Migrans se han empleado algunos fármacos, entre los que están el albendazol, mebendazol y la dietilcarbamacina (Berkow, 1997; Bogitsh and Cheng, 1998).

El albendazol es un carbamato benzimidazólico con actividad antihelmíntica contra parásitos intestinales y tisulares. Se utiliza en pacientes con Larva Migrans Visceral. Los efectos secundarios son parecidos a otros benzimidazoles, síntomas gastrointestinales superiores: dolor epigástrico, náusea, vómito, diarrea, cefalea y vértigo. Las reacciones de hipersensibilidad que incluyen prurito y urticaria son muy raras.

El mebendazol se usa como terapia alternativa en dosis altas para infecciones con *Toxocara* (Chester, 2003). Aumenta su absorción si se administra con las comidas. Las reacciones adversas son escasas y de poca intensidad, como epigastralgia, náuseas, erupción dérmica, prurito, fiebre, diarrea y vómitos. En pacientes que reciben dosis elevadas puede provocar leucopenia con neutropenia reversible (Berkow, 1997).

La dietilcarbamacina disminuye la actividad muscular e induce la inmovilización de los parásitos. Produce alteración en la superficie de las membranas de los gusanos tornándolas más susceptibles a la destrucción por los mecanismos de defensa del hospedero. Se administra por 20 días acompañada por corticosteroides cuando hay síntomas, las reacciones adversas son poco frecuentes, no son graves y desaparecen en pocos días, entre ellas se encuentran la anorexia, náuseas, cefalea y vómito (Goodman, 1994).

La fotocoagulación puede resultar muy benéfica cuando la larva es visible en el ojo (García, 2001).

Bromelia pinguin

Descripción botánica (Zomlefer, 1994)

Clase Angiospermae (Magnoliopsida)
Subclase Monocotyledoneae
Superorden Commelinanae (Liliidae)
Orden Bromeliales
Familia Bromeliaceae
Género *Bromelia*
Especie *Bromelia pinguin*

Planta con hojas en roseta, largas y angostas, el borde espinudo, inflorescencia pedunculada. Las hojas miden de 1 a 2m de altura. Las inflorescencias son de 30 a 40cm, las flores tienen pedicelos de 5 a 12mm, los sépalos son llbres, los pétalos son de color rosa y blancos en su base y margen. El fruto es una baya ovoide de 3 x 2cm, subglobosa, amarilla y ácida (Martínez, 1994; CONACYT, 1988), (Fig. 6).



Fig. 6. Frutos de *Bromelia pinguin*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Distribución geográfica

A *Bromelia pinguin* también se le conoce comúnmente como piñuela, piña de ratón, guama, guámara, cardón, etc. Se localiza en regiones de clima cálido. En México, se le encuentra en toda la costa del Pacífico y del Atlántico; en selvas caducifolias, selvas subcaducifolias y matorrales xerófilos (Martínez, 1994).

Historia

Durante mucho tiempo se ha consumido el fruto de *Bromelia pinguin* (en bebidas o crudos), en distintos lugares de México y América Central, se le atribuyen propiedades terapéuticas, su consumo cocinado o frito controla los cólicos menstruales (Chávez, 1993) y se usa como abortivo (Matadial, 1999).

En el "Ensayo para la Materia Médica Mexicana" de 1832 se menciona que al sazonar los frutos, se extrae la parte carnosa de la que se saca el zumo para hacer jarabe y se usa como antiescorbútico y diluido en agua para pacientes diabéticos. En 1836, Duchesne, afirmó que la infusión viscosa del fruto sirve como diurético y antihelmíntico. En 1844 en el "Ensayo de una Carpología" describen que las propiedades del fruto son las mismas que la piña, pero éste es más usado como antihelmíntico ya sea crudo o asado y se debe consumir en ayunas. Rolg y Mesa anuncia que "se usa para combatir a los parásitos intestinales", el jugo del fruto mezclado con leche de coco y jugo de bomba tierna es muy eficaz para combatir a los tricocéfalos (Martínez y Fragoso, 1969). En la Medicina Popular Mexicana se ha utilizado como antigotoso e hipocolesterolemiantes (Chávez, 1993), los frutos tienen actividad anticoagulante y antiinflamatoria, en tanto que sus raíces y tallos muestran actividad citotóxica (Abreu et al, 2001).

En ocasiones el consumo de estos frutos provoca efectos colaterales como irritación o ulceraciones de la mucosa de la boca y labios, vómitos, diarrea y prurito anal pero estos trastornos son ligeros y transitorios (Asenjo and Capella, 1942). El jugo del fruto es ácido, cuando se ingiere produce comezón en la boca e inflamación en los labios (Flores, 2001) y cuando se aplica en la piel causa una sensación de quemadura, pueden aparecer pequeñas úlceras en los dedos, con dolor, debido tal vez a una combinación de irritación mecánica causada por oxalato de calcio y la inyección subcutánea de enzimas proteolíticas (Schmidt, 2002).

Enzimas

Las enzimas de la familia Bromeliaceae presentan actividad SH dependiente, es decir, usan en su sitio activo a un grupo SH para degradar proteínas. Del fruto de la *B. pinguin* se aisló una enzima proteolítica llamada pinguinaína que es una glicoproteína semejante a la papaína, pero más resistente a la desnaturalización por calor, ya que su actividad óptima es a 65°C (Toro-Goyco et al, 1968). La pinguinaína está clasificada como una cisteín proteinasa muy similar a la bromelina (usada como desparasitante), pero inmunológicamente diferente (Rowan, 1990).

Por otra parte, las enzimas extraídas se usan en la industria como ablandadores de carne, curtidores de pieles y en la clarificación de cerveza, entre otros (López, 1984).

JUSTIFICACIÓN

Debido a la alta frecuencia de *T. canis* en la población canina, a la posibilidad de que el humano padezca de larva migrans visceral u ocular por la ingestión de los huevos de este nemátodo y a que los fármacos que se prescriben actualmente provocan la selección de cepas resistentes se propone estudiar el efecto que produce el jugo de los frutos de *B. pinguin* sobre la superficie cuticular de este nemátodo con el fin de buscar terapias alternativas de origen natural.

OBJETIVOS

Objetivo principal.

Demostrar *in vitro* el efecto del extracto de de *Bromella pinguin* sobre la cutícula de *Toxocara canis*.

Objetivo secundario.

Determinar la prevalencia de *Toxocara canis* en perros del sur de la Ciudad de México, D. F.

HIPÓTESIS

Si el extracto de *Bromella pinguin* posee actividad proteolítica dañará la cutícula de *Toxocara canis* provocándole pérdida de la continuidad y desarreglo de las células musculares.

Hipótesis alterna

Si el extracto de *Bromella pinguin* no posee actividad proteolítica entonces no dañará la cutícula de *Toxocara canis* por lo tanto no provocará la pérdida de la cutícula ni el desarreglo de las células musculares.

MATERIAL Y MÉTODO

Recolección de frutos

Los frutos se recolectaron en Tepic, Nayarit durante octubre, noviembre y diciembre del año 2001. Se lavaron y se trasladaron al Laboratorio de Parasitología de Instituto Nacional de Pediatría. Se mantuvieron en congelación a -70 °C hasta su uso.

Obtención del extracto.

El jugo de *Bromelia* se obtuvo en el momento de realizar los ensayos con los nemátodos. Los frutos se descongelaron a temperaturas ascendentes, ya descongelados, se exprimieron por presión manual, solo se obtuvo el jugo puro, sin semillas ni cáscara. Se midió el pH y se cuantificaron las proteínas mediante el método Bradford (Anexo I). Del extracto se prepararon diluciones con PBS 100 mM y con PB 0.2M, este último se utilizó para comprobar la acción del extracto tratando de amortiguar su pH. (Tabla 1).

Tabla 1. Extracto, diluciones y pH.

Diluciones	Extracto (mL)	PBS (mL)	pH PBS 100Mm	PB 0.2M(mL)	pH PB 0.2M
0:1	0.0	3.0	7.2	3.0	7.2
1:0	3.0	0.0	4.2	0.0	4.2
1:1	3.0	3.0	4.1	3.0	5
1:2	3.0	6.0	4.2	6.0	6.2
1:3	3.0	9.0	4.3	9.0	6.7
1:4	3.0	12.0	4.4	12.0	6.8

Determinación de proteínas del extracto de *Bromelia pinguin*

Se hizo la determinación de proteínas para tener un parámetro de la concentración de éstas presentes en el extracto. Se siguió el procedimiento de cuantificación espectrofotométrica basado en el método diseñado por Bradford a partir de una proteína conocida (albúmina a una concentración de 10 mg disueltos en 10 mL de NaCl 0.15 M). La concentración de albúmina y del extracto se comprobó con un análisis espectrofotométrico a 278nm, en el espectrofotómetro UV Ultrospec III. Este procedimiento se realizó tres veces, de ellos se obtuvo una curva patrón a la cual se le extrapolaron los resultados de los tubos problema.

Obtención de nemátodos

Se realizaron varias visitas al Centro de Control Canino de Culhuacan de Febrero del 2001 a Abril del 2002. A los perros sacrificados se les hizo una incisión abdominal, se extrajeron los intestinos, los cuales se colocaron en un recipiente de plástico debidamente etiquetado y se trasladaron al Instituto. En el laboratorio se revisaron los intestinos en las siguientes 5 horas para lo cual se colocaron en una charola de disección y se les hizo un corte longitudinal con el fin de obtener los vermes. Los parásitos se colocaron en vasos de precipitados y se lavaron tres veces con PBS. Con ayuda del microscopio estereoscópico se identificaron los nemátodos de tal manera que solo se trabajó con *Toxocara canis*.

Las especies pertenecientes al género *Toxocara* fueron identificadas siguiendo la propuesta de Schmidt (Schmidt, 1983)

Típico de *Toxocara*

- Pequeño ventrículo glandular en la parte posterior del esófago.
- La cola se estrecha abruptamente por debajo del ano.
- Huevos con superficie puntuada o con hoyos.
- Su cuerpo se dobla ventralmente.
- Posee alas largas y delgadas. Los machos en la cola presentan membranas similares.

T. cati

- Tiene alas anchas y cortas.

Toxascaris leonina

- Huevos con superficie lisa.
- Alas largas y delgadas.
- Su cuerpo se dobla lateralmente.

Ensayo biológico.

Los nemátodos obtenidos se dividieron en nueve grupos. Cada grupo estuvo formado por cinco nemátodos. El Grupo I correspondió a un control, los parásitos se incubaron con PBS pH 7.2, durante 60 minutos y 24 horas a 37°C. Grupo II: fue otro control, los nemátodos se incubaron con PBS pH 4.2, 120 minutos. Grupo III: parásitos expuestos al extracto puro y a las diluciones (Tabla I), durante 30 minutos. Grupo IV: nemátodos expuestos al extracto puro y a las diluciones, durante 60 minutos. Grupo V: los parásitos se incubaron con el extracto puro y las diluciones, durante 120 minutos. Grupo VI: incubación con el extracto puro durante 180 minutos. Grupo VII: parásitos expuestos al extracto puro durante 240 minutos. Grupo VIII: nemátodos expuestos al extracto puro y a las diluciones con PB con pH

de 5-7.2 (Tabla I) durante 60 y 120 minutos a 37°C, y el en Grupo IX los parásitos se expusieron al extracto puro a 24°C, durante 24 horas.

Los nemátodos de cada uno de los nueve grupos se fijaron con formalina al 10%, se colocaron en frascos y se etiquetaron.

Inclusión en resina epóxica

Para realizar las observaciones de la estructura de la cutícula se hicieron cortes transversales de dos o tres milímetros de grosor, con una navaja de rasurar de la región cefálica, media y caudal de los nemátodos fijados. Posteriormente los fragmentos se lavaron con PBS 0.1M tres veces durante 10 minutos.

Deshidratación gradual e inclusión.

Las muestras se sometieron a un proceso de deshidratación gradual con alcoholes ascendentes, se utilizó etanol al 50%, 70%, 80%, 90%, 96% y absoluto, en cada paso se realizaron dos cambios de 10 minutos, excepto con el último, que fueron de 15 minutos cada uno. Enseguida se introdujeron en óxido de propileno (2 cambios de 15 minutos cada uno). Posteriormente las muestras se mantuvieron en dos mezclas de preinclusión compuestas por óxido de propileno y resina epóxica (2:1 y 1:2); en cada mezcla permanecieron durante 24 horas a 4°C.

Para incluir las muestras se dejó evaporar el óxido de propileno. En moldes de plástico se introdujeron las muestras de los gusanos en el medio de inclusión, orientándolas para obtener cortes transversales del parásito y la polimerización de la resina se realizó en una estufa a 60 °C durante 24 horas.

De este material se obtuvieron los cortes de 1 micrómetro en el Ultramicrotomo (Reichert Jung), éstos fueron teñidos con azul de toluidina y fueron revisados y fotografiados en un microscopio óptico de campo claro.

RESULTADOS

Concentración de proteínas

La concentración promedio de proteínas encontrada en frutos de *Bromella pinguin* fue de $19.6 \pm 6.4 \mu\text{g/mL}$ (Fig. 7).

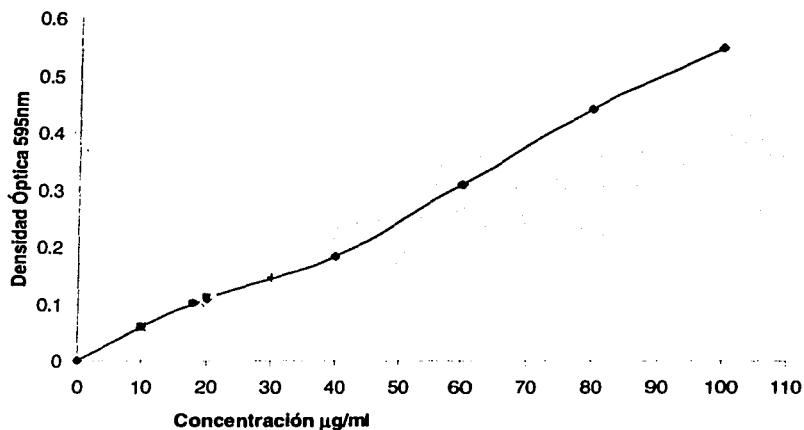


Fig. 7. Gráfica que muestra la concentración de proteínas del extracto obtenido del jugo de *Bromella pinguin*.

- Control —■— Experimental 1 Experimental 2 Experimental 3
—*— Experimental 4 —●— Experimental 5 —+— Experimental 6

Obtención de nemátodos

En la búsqueda de la fase adulta de *T. canis* se revisaron 109 intestinos de los cuales 53 eran de perros cachorros, 7 de jóvenes y 49 de adultos; los cachorros se encontraron más parasitados que los perros adultos (Fig. 8).

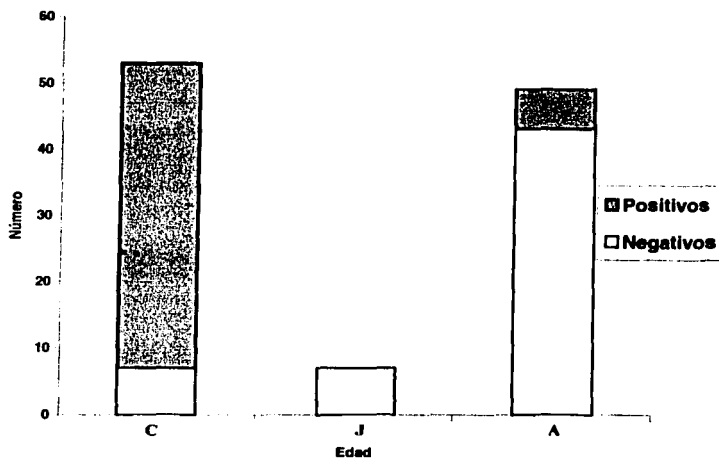


Fig. 8. En la gráfica se muestran los perros (intestinos) revisados, agrupados por edad y los que fueron positivos a *T. canis*. Cachorros (C), Jóvenes (J) y Adultos (A).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I. Incubación con PBS pH 7.2 durante 60 minutos y 24 horas a 37° C.

Los nemátodos no presentaron daño en la cutícula; incluso permanecieron vivos después de haberlos incubado 24 horas. (Fig. 9). En los cortes histológicos de la región anterior, media y posterior se observó la estructura completa, con la cutícula íntegra (Fig. 10).

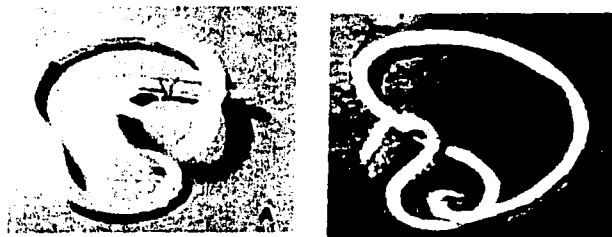


Fig. 9. *T. canis*. A) 60 minutos y B) 24 horas. Cutícula íntegra

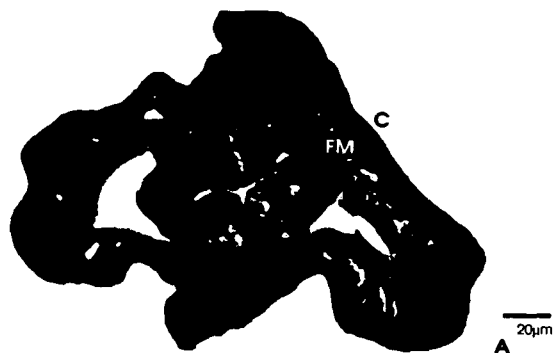
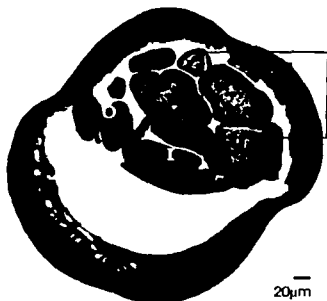


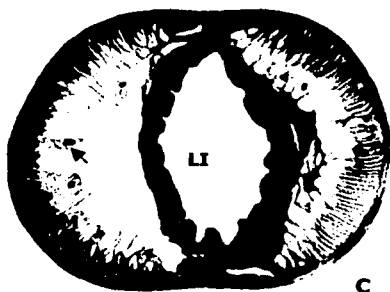
Fig. 10. Hembra de *T. canis* en PBS. A) Región anterior, con la cutícula íntegra, esófago (E).



B



20µm



H

20µm



10µm

Fig. 10. Hembra de *T. canis* en PBS. B) Región media, con úteros (U) y ovarios (O), el recuadro muestra una ampliificación. C) Región posterior, lumen intestinal (LI), la flecha muestra el núcleo de una fibra muscular, en el acercamiento se observa la cutícula (C), hipodermis (H) y las fibras musculares (FM).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II. Incubación con PBS pH 4.2 durante 120 minutos a 37°C.

Los nemátodos incubados en PBS con pH 4.2 no mostraron daño alguno a nivel macroscópico ni microscópico, la cutícula permaneció sin alteración, por lo que no hubo salida de vísceras. Después de 120 minutos de permanecer bajo estas condiciones los parásitos aún estaban vivos.

Efecto del extracto puro y con diluciones con PBS (100mM)

III. Incubación durante 30 minutos.

A) Extracto puro

En tres nemátodos hubo daño irreversible, se observaron lesiones con principio de evisceramiento en la región media, en algunos hubo salida de material y ampollas en la región posterior. En la región media la cutícula empezó a abrirse en dos partes. (Fig. 11) En los cortes histológicos, se observó que la cutícula se rompió a nivel del cordón ventral, el daño fue más evidente en la región media en la cual la cutícula se rompió y se desprendió de hipodermis y músculo (Fig. 12).



Fig. 11. Macho de *T. canis*. Cuerpo dañado en algunas regiones la salida de órganos es evidente (flecha).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

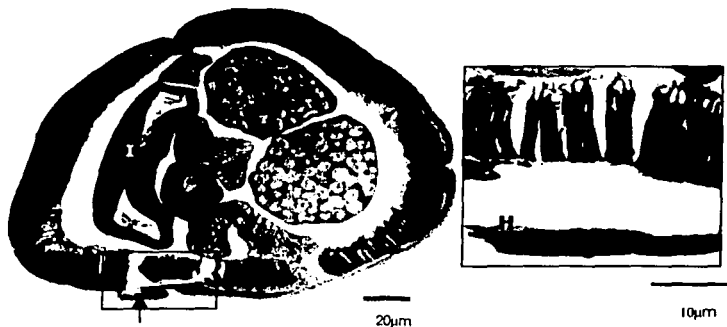


Fig. 12. Región media de *T. canis*. Desprendimiento completo de la cutícula (C) y un espacio entre la hipodermis (H) y las fibras musculares (FM). El recuadro muestra una ampliación de la zona dañada. Útero (U), Intestino (I)

B) Dilución 1:1

Un nematodo presentó varios puntos con ampollas y evisceración del primer tercio a la mitad, en los nemátodos restantes no se observó daño macroscópico (Fig. 13).



Fig. 13. Hembra de *T. canis*, las flechas muestran las ampollas en el cuerpo

C) Dilución 1:2

La evisceración fue evidente en cuatro de los nemátodos, principalmente ocurrió en la región media y el daño es menor en el primer y último tercio. En el cuerpo hay ampollas o abultamientos. (Fig. 14)



Fig. 14. *T. canis*. Se observan varios puntos de salida de órganos.

D) Dilución 1:3

Tres de los cinco nemátodos resultaron eviscerados en la región media principalmente, en el resto del cuerpo solo había pequeñas lesiones. (Fig. 15)



Fig. 15. Macho de *T. canis*, la flecha muestra una ampolla gigante en el cuerpo.

E) Dilución 1:4

Dos nemátodos resultaron dañados. Presentaron lesiones y ampollas más visibles en la región media que en el resto del cuerpo, apenas es perceptible la salida del contenido interno (Fig. 16).

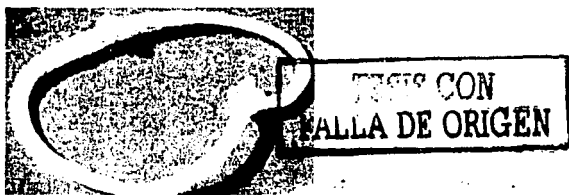


Fig. 16. Macho de *T. canis*. La flecha muestra la salida de material del interior del parásito.

IV. Incubación durante 60 minutos

A) Extracto puro

Todos los parásitos presentaron daño en todo el cuerpo pero las lesiones y ampollas de la región media a la posterior fueron más grandes, algunos tenían puntos de evisceramiento (Fig. 17); los cortes histológicos mostraron que en las regiones anterior, media y posterior la cutícula se rompió y desapareció en la zona del cordón ventral dejando al músculo expuesto; la región anterior se desintegró la hipodermis y el músculo se separó incluso hubo salida de vísceras. (Fig. 18).



Fig. 17. Hembra de *T. canis*. Múltiples ampollas en todo el cuerpo (flechas).

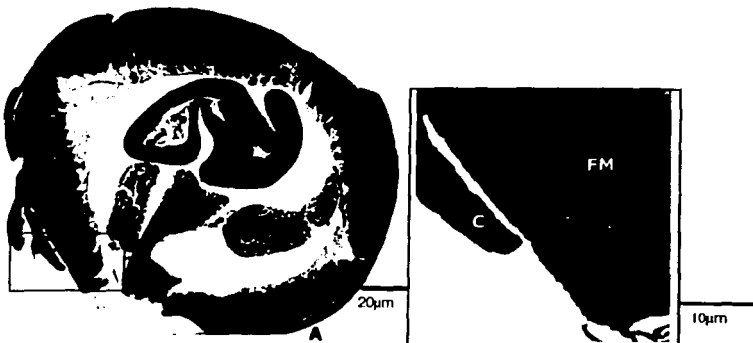


Fig. 18. Macho de *T. canis*. A) Región anterior. Ruptura y separación de la cutícula en la zona ventral, pérdida de músculo y salida de vísceras. En el recuadro, un acercamiento en donde se aprecia la separación cuticular.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



B



C

Fig. 18. Macho de *T. canis*. B) Región media, la cutícula se rompe a nivel del cordón ventral (flecha). C) En la región posterior se aprecia la ausencia de la cutícula. Fibras musculares (FM), Intestino (I), cutícula (C) y lumen Intestinal (LI).

B) Dilución 1:1

Cuatro de los cinco nemátodos mostraron daño en todo el cuerpo pero es mayor en los últimos dos tercios, solo un parásito no sufrió daño. (Fig. 19).



Fig. 19. Hembra de *T. canis*. Ampollas en todo el cuerpo con salida de vísceras (flechas).

C) Dilución 1:2

Todos los nemátodos incubados resultaron dañados, la boca resultó destruida y se observaron lesiones y ampollas muy abultadas en todo el cuerpo, en la región media empezaron a salir los órganos del nemátodo. (Fig. 20)



Fig. 20. Hembra de *T. canis*. Pequeñas ampollas en todo el cuerpo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

D) Dilución 1:3

De cinco nemátodos analizados en tres de ellos se observó daño. Las lesiones y puntos de evisceración fueron evidentes en todo el cuerpo, principalmente en la región media (Fig. 21).



Fig. 21. Hembras de *T. canis*. Los nemátodos están muy dañados, al grado de que su cuerpo además de que tiene ampollas en algunas partes ya está roto y con evisceraciones (flechas).

E) Dilución 1:4

En cuatro de cinco nemátodos la boca resultó totalmente destruida, en la región media se presentan lesiones y ampollas con algunos puntos en donde empezó a salir material, en la región posterior el daño fue menor. (Fig. 22). En las observaciones microscópicas se vio que la ruptura de la cutícula empezó en la zona ventral a nivel de cordón, el daño resultó más evidente en las regiones media y posterior del parásito, en las que la cutícula se destruyó completamente permitiendo la salida del contenido interno. (Fig. 23)



Fig. 22. Hembras de *T. canis*. La región anterior está muy dañada, incluso hubo pérdida de cutícula, lo cual se comprobó porque dejó al esófago descubierta (flechas).



TESIS CON
 20/1777
 FALLA DE ORIGEN

Fig. 23. A) En la región anterior la cutícula está rota a nivel del cordón ventral (flecha), intestino (I), ovario (O) y fibras musculares (FM). B) y C) En la Región media y posterior se observa la pérdida de la cutícula, con evisceración, testículo (T).

V. Incubación durante 120 minutos.

A) Extracto puro

Los nemátodos incubados con este tratamiento presentaron lesiones y ampollas en todo el cuerpo. A nivel macroscópico se observó que la boca fue destruida completamente, por lo que el esófago quedó expuesto. La cutícula de la región media se rompió por la mitad, de tal forma que permitió que se saliera el contenido corporal (Fig. 24). En los cortes histológicos de las tres regiones, la cutícula estuvo ausente en la zona ventral, así que desapareció la hipodermis y el músculo quedó sin delimitación lo que produjo que éste se desprendiera y que se liberaran los órganos: úteros e intestinos (Fig. 25).

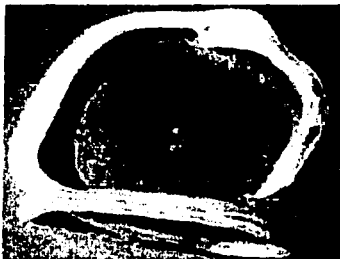


Fig. 24. Hembra de *T. canis*, cutícula abierta en dos partes (flecha).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Fig. 25. Hembra de *T. canis*. A) Región anterior completamente dañada, se perdió la cutícula en casi la mitad del cuerpo, hubo liberación de órganos internos. Intestino (I), fibras musculares (FM). B) Región media, cutícula ausente en la mayor parte del cuerpo, con separación de las fibras musculares. C) Región posterior, falta toda la zona ventral del cuerpo incluyendo cutícula (C), hipodermis y músculo, útero (U).

B) Dilución 1:1

En los cinco nemátodos hubo daño en todo el cuerpo, la evisceración ocurrió en la región media porque la cutícula se abrió por la línea media ventral. A nivel microscópico se observó que la cutícula se rompió en la zona ventral y en la lateral, el cordón está roto y la musculatura no se desprendió. (Fig. 26).

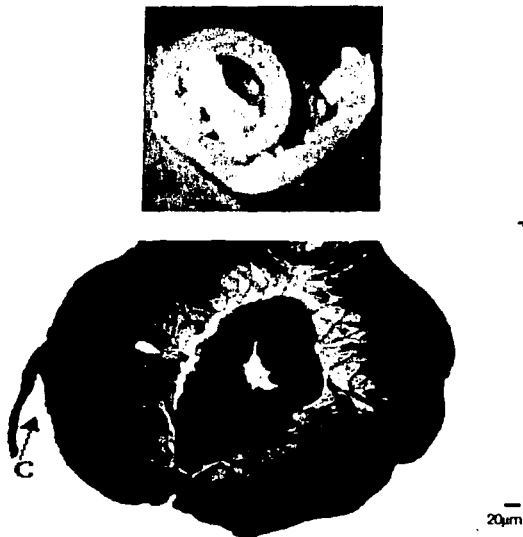


Fig. 26. *T. canis*. En la fotografía superior se observa todo el cuerpo dañado, con ampollas y con la cutícula desgarrada (flecha). En la inferior el corte histológico, con desprendimiento de la cutícula (flecha pequeña), esófago (E) y fibras musculares (FM).

BALLA DE ORIGEN

C) Dilución 1:2

El primer tercio se encontró muy dañado, ya que la región cefálica se destruyó completamente y el esófago quedó expuesto. En región media, la cutícula se abrió a la mitad. En el resto del cuerpo hubo puntos pequeños de evisceración. En los cortes, en la zona ventral, la cutícula se desprendió de la hipodermis y del músculo. En la región lateral, no hubo cutícula y solo quedó la hipodermis (Fig. 27).



Fig. 27. La fotografía de la izquierda muestra la estructura macroscópica de una hembra de *T. canis*. Sin cutícula en la región anterior y el esófago al descubierto (flecha). En el corte histológico (derecha), hubo desprendimiento de la cutícula de la hipodermis y en la región lateral no hubo cutícula, hipodermis (H), ovario (O), úteros (U) y fibras musculares (FM).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

D) Dilución 1:3

El daño fue evidente en todo el cuerpo, en la cutícula hubo pequeños puntos por donde salió el material interno. En la región anterior no hubo daño, pero en la región caudal o posterior se observaron ampollas abultadas (Fig. 28). A nivel microscópico, el daño fue más evidente ya que en toda la zona ventral de la región anterior desapareció la cutícula e hipodermis y el músculo se separó. En la región media, se encontró ruptura de la cutícula y del cordón ventral (Fig. 29).



Fig. 28. Hembra de *T. canis*. Ampollas en todo el cuerpo (flechas).

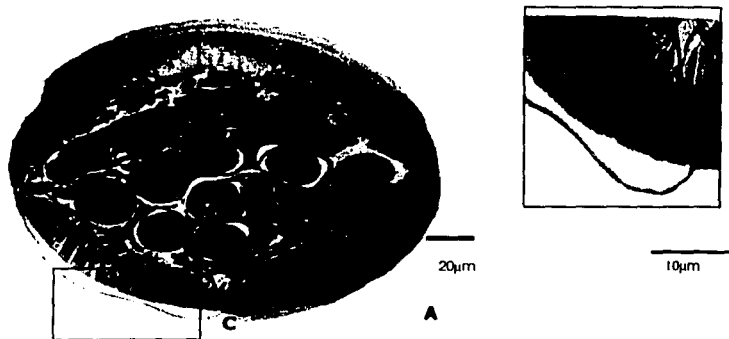


Fig. 29. Hembra de *T. canis*. A) Región anterior, sin cutícula en casi la mitad del cuerpo. En el acercamiento, las fibras musculares sin hipodermis ni cutícula.

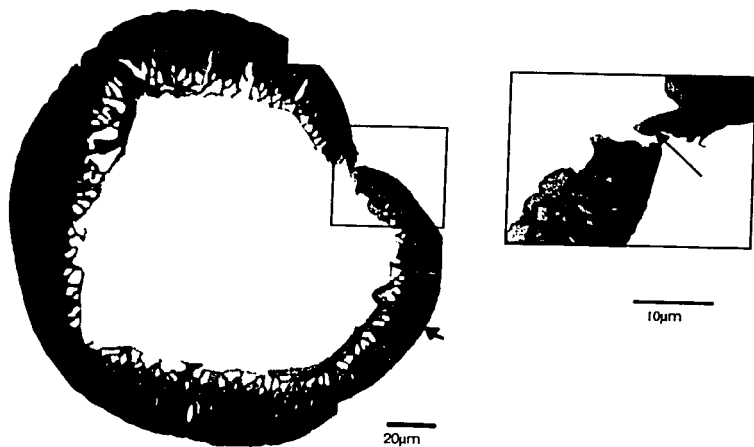


Fig. 29. Hembra de *T. canis*. B) Región media, pérdida de la cutícula en una cuarta parte del cuerpo (flecha pequeña) y ruptura a nivel del cordón ventral. En el recuadro, acercamiento a nivel del cordón ventral (flecha grande).

E) Dilución 1:4

La región cefálica destruida, esófago al descubierto, en el resto del cuerpo se observaron algunos puntos de abultamiento y evisceración, con salida de material (Fig. 30).



Fig. 30. *T. canis*. En todo el cuerpo ampollas pequeñas (flecha).

VI. Incubación con el extracto puro durante 180 minutos.

Los nemátodos mostraron daño en todo el cuerpo, la evisceración fue muy evidente e incluso el cuerpo se fragmentó en varios segmentos (Fig. 31).



Fig. 31. *T. canis* fragmentado en varias regiones.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VII. Incubación con el extracto puro durante 240 minutos.

Los ejemplares que fueron sometidos al extracto puro por más de dos horas y media sufrieron daños severos, ya que el cuerpo se fragmentó en trozos pequeños provocando que el gusano ya no fuera reconocible (Fig. 32).



Fig. 32. *T. canis*. Cuerpo destruido totalmente.

VIII. Efecto del extracto puro y diluciones con PB 0.2 M, pH 5-7.2 durante 60 y 120 minutos a 37° C.

No hubo alteración en la cutícula ni evisceración.

IX. Efecto del extracto puro a temperatura ambiente (24°C)

En los nemátodos expuestos durante dos horas no se observó daño en la cutícula. En los parásitos sumergidos en el extracto durante 24 horas presentaron el cuerpo fragmentado en varias partes en forma similar a la presentada en los nemátodos incubados a 37°C durante tres horas. Por lo tanto se demostró que la actividad proteolítica se incrementó conforme aumentó la temperatura.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tratamiento de Nemátodos

De 76 nemátodos expuestos con el extracto y las diluciones con PBS (100mM), 53 (70%) de ellos resultaron con daño macroscópico (Fig. 33). Para el estudio microscópico, se realizaron 84 cortes, de ellos 66 (80 %) presentó daño y mostraron ruptura de la cutícula, que no era visible macroscópicamente. El daño más grande se encontró en los nemátodos con mayor tiempo de incubación (Fig. 34)

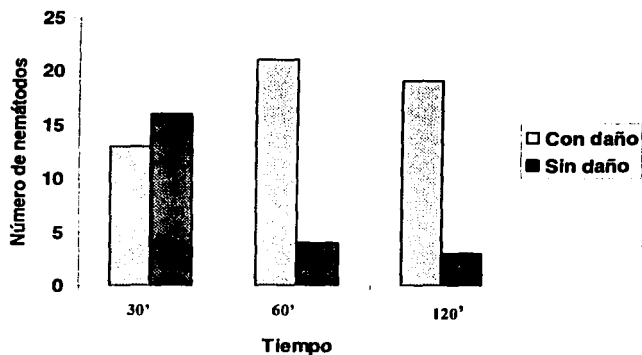


Fig. 33. Revisión macroscópica de los nemátodos expuestos al extracto y diluciones con PBS (100mM).

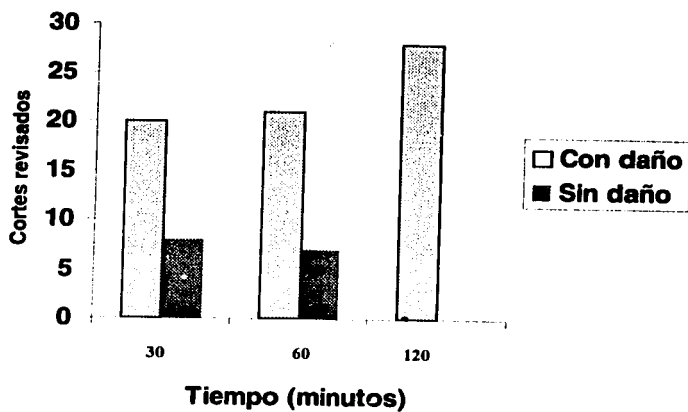


Fig. 34. Revisión microscópica de los cortes transversales de los nemátodos expuestos al extracto puro y diluciones con PBS (100mM).

DISCUSIÓN

Después de haber sometido a nemátodos de la especie *Toxocara canis* a diferentes concentraciones del extracto del *Bromelia pinguin* con el fin de observar el efecto que había sobre la cutícula se puede concluir que los que se incubaron solo con PBS no mostraron daño alguno. Su estructura no se alteró, permaneció intacta de manera que la cutícula, epidermis y musculatura estuvieron bien definidas, incluso permanecieron con vida después de 24 horas.

Se llegó a pensar que la acidez del extracto (pH 4.2) podía ser causante de la ruptura de la cutícula, sin embargo se demostró que no fue así ya que los nemátodos incubados en PBS (pH 4.2) no sufrieron daño en la cutícula por lo tanto no se observó evisceración.

El pH resultó ser un factor fundamental para mantener la actividad enzimática de las proteínas presentes en el extracto, esto se observó cuando se prepararon diluciones del extracto con amortiguador de fosfatos 0.2 M. En este caso la cutícula de los nemátodos no se alteró, es decir, la actividad proteolítica óptima se encontró en pH ácido (4 - 5), en tanto que en pH mayor a 5 las componentes del extracto se inactivaron provocando que no hubiera daño cuticular ni evisceramiento.

El efecto causado por enzimas presentes en el extracto se observó a simple vista, empezó generalmente con la ruptura de la cutícula a nivel del cordón ventral. Primero aparecieron pequeñas lesiones y ampollas que hicieron que la cutícula se abriera por la línea media de la región ventral, el daño fue gradual, conforme transcurrió el tiempo, el parásito se evisceró, así que salieron las estructuras internas empezando por el músculo y los órganos hasta que se produjo la destrucción total del parásito quedando el cuerpo irreconocible.

A nivel macroscópico, a los 30 minutos de que los nemátodos estuvieron sumergidos en el extracto y las diluciones con el PBS 100mM mostraron lesiones en la cutícula, con pequeños abultamientos y ampollas, principalmente en la región media; pero, solo en algunos puntos. La cutícula se abrió en la línea media de la región ventral o lateral, como si se le hubiera hecho un corte longitudinal.

A los 60 minutos, la mayor parte del cuerpo estuvo dañado, desde la región cefálica, pasando por la media, hasta la caudal. En algunos nemátodos, la cápsula bucal se destruyó completamente, dejando al esófago descubierto y se observó salida de material interno, tal vez músculo.

Los nemátodos expuestos a 120 minutos mostraron gran daño, las lesiones eran grandes, de tal manera que la cutícula se abrió liberando a los órganos completamente o en algunos casos se perdió.

En las observaciones de los cortes al microscopio de nemátodos expuestos con el extracto puro se demostró que el daño fue proporcional al tiempo de incubación. Así, los que estuvieron 30 minutos apenas mostraron la cutícula rota (Fig. 12), en tanto que los de 60 minutos presentan un daño severo. La ruptura de la cutícula dejó sin sostén a la epidermis y a la musculatura; por lo que, empezó a disgregarse y los órganos se salieron (Fig. 18). En los nemátodos expuestos a 120 minutos, el daño fue mayor y evidente, prácticamente faltó la mitad del cuerpo y cuando se expusieron más tiempo, hubo destrucción total del parásito. La región media fue la que se dañó más rápidamente y en la región anterior y posterior el daño fue más lento (Fig. 25).

En las diluciones el efecto fue similar, casi no hubo diferencias entre éstas y el extracto puro. En la dilución 1:4 (Fig. 23) con una hora de incubación, el daño observado en el corte histológico fue similar al del extracto puro (Fig. 18).

Cabe mencionar que la mayoría de las veces el daño se presentó a nivel del cordón ventral, fue ahí en donde empezó a romperse la cutícula y poco a poco se destruyó hasta que dejó expuesta a la hipodermis y a la musculatura, hasta que éstas dos se liberaron, debido a que ya no estuvieron sujetas por la cutícula, de tal forma que el contenido del cuerpo se esparció. Así, puede pensarse que en la región ventral existe alguna discontinuidad o que la cutícula en esta región es más delgada lo que permitió que la cutícula se rompiera con mayor facilidad y se produjera la destrucción del parásito.

El efecto que provoca el extracto obtenido de las frutas de la *Bromelia pinguin* fue muy evidente. La efectividad fue alta en condiciones *in vitro* ya que aún en diluciones bajas, el nemátodo murió en menos de 30 minutos y con más tiempo de incubación, las enzimas digirieron la cutícula hasta que se destruyó todo el cuerpo.

La temperatura jugó un papel importante, debido a que el aumento en ésta aceleró el proceso de destrucción cuticular. Los nemátodos expuestos con el extracto a temperatura ambiente, tardaron más de dos horas para que el daño fuera visible, en comparación, con los que se colocaron durante 30 minutos a 37° C en donde las lesiones fueron desde una pequeña hinchazón hasta apertura de la cutícula.

En este estudio no se purificó ningún componente de extracto, pero la pinguinaína podría ser uno de los compuestos responsables de la destrucción de la cutícula ya que esta enzima actúa como cisteína proteasa con actividad SH dependiente y la cutícula de los nemátodos muestra una estructura específica con residuos de cisteína dentro de los polipéptidos, por lo que este aminoácido tiene un papel central en el ensamble de las cadenas de colágena (Kingston, 1991). Por otra parte, la cutícula está formada principalmente por pequeñas cadenas de colágena que están unidas covalentemente por puentes disulfuro cruzados posiblemente a través de residuos de lisina o tirosina para formar grandes proteínas.

La concentración de proteínas del extracto se hizo mediante el método de Bradford, se encontró en promedio una concentración de 19.6 ± 6.4 microgramos de proteína por mililitro de extracto. Por lo que por cada tres mililitros del extracto contenían aproximadamente 58.8 microgramos de proteína. Aún en las diluciones de 1:4 (3mL de extracto: 12mL de PBS) la actividad proteolítica persistió ya que provocó ruptura de cutícula y destrucción del parásito.

En relación a la edad de los perros y a la frecuencia de parásitos encontrados en este trabajo, se encontró que los cachorros tuvieron una frecuencia más alta (87%) que los perros adultos (12%), lo cual concuerda con la literatura y lo anterior se puede explicar probablemente porque los cachorros aún no tiene inmunidad desarrollada a estos parásitos (Lamothe y García, 1988).

La importancia de este trabajo radica en que da lugar a otras investigaciones como determinar el efecto del extracto puro en condiciones *in vivo* y lograr el aislamiento y obtención de los compuestos activos de tal forma que en un futuro pueda aplicarse como una terapia alternativa para combatir a estos parásitos y a otros con estructura similar.

CONCLUSIONES

El extracto de los frutos de *Bromelia pinguin* destruyó la cutícula de *Toxocara canis*.

La efectividad observada fue del 100% ya que todos los nemátodos expuestos al extracto murieron y en las observaciones bajo el microscopio en 80% de ellos se registró daño en la cutícula con solo 3mL del extracto, lo que equivale a casi 60 µg de proteína.

Los componentes del extracto fueron pH-dependientes. En pH ácido (4.1 - 4.4) provocó daño muy evidente en la cutícula, en tanto que en pH más básico (mayor a 5) ya no se observó daño cuticular, incluso, los nemátodos permanecieron vivos.

El tiempo de incubación fue determinante, ya que conforme éste aumentó, el efecto antihelmíntico fue mayor, es decir, con más tiempo de exposición de los nemátodos, se produjo destrucción total del cuerpo.

La temperatura también jugó un papel importante para la acción proteolítica del extracto ya que a temperatura ambiente se produjo el efecto pero más lentamente.

La cutícula de *T. canis* parece ser más débil en la zona ventral a nivel del cordón ventral ya que fue el sitio en donde empezó la ruptura.

Es necesario investigar por qué la cutícula de *T. canis* es menos resistente en el segundo tercio de la región ventral.

La frecuencia de infección de cachorros fue más alta que la de perros adultos.

Se debe aislar y purificar el compuesto responsable de la destrucción de la cutícula, para determinar si existe una cuticulasa en *B. pinguin* entre otras incógnitas por investigar.

Anexo

Índice de reactivos

1.-Solución amortiguadora fosfatos (PBS) 1000 mL (1X), pH 7.2.

NaCl	6.5g
K ₂ HPO ₄	2.8g
KH ₂ PO ₄	0.4g

Se aforó a 1000 mL con H₂O destilada.

2.-Preparación de amortiguador de fosfatos (PB), pH 7.2

a) Solución de fosfato de sodio monobásico 0.2M

NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	5.52g
H ₂ O	200.0 mL.

b) Solución de fosfato de sodio dibásico 0.2M

Na ₂ HPO ₄ anhidro	25.55g
H ₂ O	900.0 mL

c)) PB 0.2M pH 7.2

Solución a	190.0 mL.
Solución b	810.0 mL.

3.- Preparación de amortiguador de fosfatos (PBSalino) 0.85% (0.1M)

PB 0.2M pH 7.2	1000.0 mL.
NaCl	8.5 g
H ₂ O	1000.0mL.

4.-Formalina

Formaldehído	200.0 mL
PBSalino	1800.0mL

5.-Preparación de la resina epóxica (25 mL)

Glicidólica de etér (polímero)	10.13g
Anhidrido dodecenil succinico DDSA (endurecedor)	9.3g
Anhidrido metilnorbil carboxilico NMA (plastificador)	3.8g
Tris dimetil aminofenol DMP (catalizador)	0.33 mL

6.-Preparación del Azul de toluidina

Azul de toluidina	1.0g
Tetraborato de sodio (Borax)	1.0g
Agua destilada	100 mL

Se mezcló el agua destilada con el Borax, después se agregó el azul de toluidina y se agitó hasta que se diluyó totalmente, por último se filtró.

7.- Método Bradford.

Se hizo el procedimiento de cuantificación espectrofotométrica de proteínas basado en el método diseñado por Bradford a partir de una proteína conocida (albúmina, a una concentración de 10 mg disueltos en 10 mL de NaCl 0.15 M). La concentración de albúmina y la de las proteínas del extracto, se midió con un análisis espectrofotométrico a 278nm, en el espectro UV Ultrospec III.

Reactivo de Bradford	
Azul brillante de Coomassie G-250	100mg
Etanol 95%.	50 mL.
Ácido fosfórico 85% (p/v)	100 mL
H ₂ O (aforar)	1000 mL.

Las soluciones contenían de 10 - 100 µg de albúmina y se tomó un volumen 0.1ml de cada una en un tubo de ensaye de 12 x 100mm, al tubo control solo se le puso solución de NaCl 0.15 M. A todos los tubos se les agregó 5.0 mL de reactivo para Bradford. Por último, se hizo la gráfica patrón de proteínas de la cantidad de albúmina contra la absorbancia obtenida a una longitud de onda de 595 nm.

A otro grupo de tubos se les agregó 10.0 µL del extracto y 5 mL del reactivo para Bradford y se leyeron a una longitud de onda de 595nm. La absorbancia que resultó del problema se interpoló a la curva patrón y se extrapoló para obtener la cantidad de proteína presente en la muestra (Fig. 7).

REFERENCIAS

Abreu J, Miranda M, Toledo G, Castillo O. Actividad farmacológica preliminar del fruto de *Bromella pinguin* L. (piña de ratón). Rev Cubana Farm. 2001; 35(1):56-60

Aguirre M. Elaboración de Antígenos de *Toxocara canis* y su evaluación con la técnica de Elisa. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. México, 1993.

Alawa C; Adamu A; Gefu J; Ajannusi O; Abdu P; Chiezey N; Alawa J; Bowman D. In vitro screening of two Nigerian medicinal plants (*Vernonia amygdalina* and *Annona senegalensis*) for anthelmintic activity. Vet Med. 2003; 113: 73-81.

Asenjo C, Capella M. A new protease from *Bromella pinguin* L. Science. 1942; 95(2454):48-49

Barriga O. Rational control of canine toxocarasis by the veterinary practitioner. J Amer Vet Med Assoc. 1991; 198:216-21.

Berkow R. Manual Merck. Información Médica para el hogar. España. Editorial Océano, 1997.

Bogitsh B, Cheng, T. Human Parasitology. 2nd ed. USA. Academic Press 1998.

Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding. Analytical Biochem. 1976; 72: 248-54

Brusca R, Brusca G. Invertebrates. USA. Sinauer Associates Inc. Publishers. 1990

Colin J. Parasites and Parasitic Diseases of Domestic Animals, an online book of text and images. Enero 24, 2000 Disponible en: <http://cal.nbc.upenn.edu/merial/Default.htm>

CONACYT, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Flora Taxonómica Mexicana. Vol. I. México, 1988.

Chávez M. Estudio químico y biológico preliminar de *Bromella pinguin*. (Bromellaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México, 1993.

Cheng T. Parasitología General. España Edit, A.C. 1978.

Chester P. Parasitología Clínica de Craig Faust. 3ª ed. México. Edit. Masson Doyma México. 2003.

De Haro I. Diagnóstico morfológico de los parásitos. 2ª. ed. México. Méndez Editores. 1995.

Fernández F, Cantó G. Frecuencia de helmintos de perros sin dueño sacrificados en la ciudad de Querétaro, Querétaro, México. Vet Mex. 2002; 33(3): 247-53

Fernández P, Martínez I, Gutiérrez Q, Vázquez O, Pérez MJ, García Y. Serología para detección de helmintos extraintestinales en niños con alteración neurológica. Rev Mex Patol Clin. 1999; 46 (4): 217-21

Fisher M. Studies on the control of *Toxocara canis* in breeding kennels. Vet Parasitol. 1994; 55: 87-92

Flores J. Plantas de la flora yucatanense que provocan alguna toxicidad en el humano. Rev Biomed. 2001; 12(2):86-96.

García L. Diagnostic Medical Parasitology. USA. ASM Press, 2001.

Goodman, A. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 8ªed. Argentina Edit. Médica Panamericana. 1994.

Kingston, I. Nematode Collagen Genes. Parasitol Today. 1991; 7(1):11-5.

Lamothe R., García L. Helmintiasis del hombre en México. México. AGT Editores 1988.

Lapage G. Parasitología Veterinaria. México. Cía. Edit. Continental. 1981

López F. Componentes proteicos de la pinguinaína. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México. 1984.

Lloyd S. Toxocaríasis. J of Small Animal Pract. 1986; 27(10): 655-61

Marmor M; Glickman L; Shofer F; Amdurer L; Rosenberg C; Cornblatt B; Friedman S . *Toxocara canis* Infection of children; Epidemiologic and Neuropsychological findings. Am J Pub Health. 1987; 77(5):554-59

Martínez I, Fernández A, Vázquez O, Ruiz A. Frecuencia de *Toxocara canis* en perros y áreas verdes del sur de la ciudad de México, Distrito Federal. Rev Vet Mex. 1998; 29(3). Disponible en : <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/revvetmex/29-3.pdf>

Martínez I, Gutiérrez M; Pérez M; Vázquez O; García Y. Reactividad serológica a antígeno de *Toxocara canis* en una población escolar. Patol Clín 1997; 44(2):85-9

Martínez M. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. México. Fondo de Cultura Económica. 1994.

Martínez, R. y Fragoso, V. Estudio clínico y parasitológico de la acción antihelmíntica de *Bromelia pinguin*. Rev Inv Sal Pub. 1969; 29(4):268-289

Matadlal, L. The effect of *Bromelia pinguin* extract on the pregnant rat uterus. West Indian Med J. December, 1999, 48(4):148-9.

Overgaauw P. Toxocarosis in dogs and cats. Vet Quart. 1998; 20

Park H. A seroepidemiological survey for toxocarosis in apparently healthy residents in Gangwon-do, Korea. J Parasitol. 2002; 40(3):113-7.

Parsons, J. Ascarid Infections of Cats and Dogs. Vet Clin of North Am; Small Animal Pract. 1984; 17(6): 1307-35

Rowan A. The cysteine proteinases of the pineapple plant. Biochem J. 1990; 15:266(3):869-75

Sadjjadi MD. Seroprevalence of *Toxocara* Infección in school children in Shiraz, Southern Iran. J Trop Ped. 2000; 46(6):327-30

Schantz P. and Glickman, L. Toxocaral Visceral Larva Migrans. The New England J Med. 1978; 298(8):436-39.

Schmidt G. Fundamentos de Parasitología. México. Compañía Editorial Continental, 1983.

Schmidt R. Bromeliaceae (Pineapple family). Botanical Dermatology Database (BoDD) 2002. Disponible en:
<http://BoDD.cf.ac.uk/BotDermFolder/BotDermB/BROM.html>

Schneider T. Investigations into the prevention of neonatal *Toxocara canis* infections in puppies by application of Doramectin to the bitch. J Vet Med. 1996; 43: 35-43.

Toro-Goyco E; Marezki A, Matos M. Isolation, Purification, and Partial Characterization of Pinguinain, the Proteolytic Enzyme from *Bromella pinguin* L. Arch Biochem Biophys. 1968; 126: 91-104.

Toxocarosis. Parasitic Disease Information. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 20-03-2002. Disponible en:
http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/toxocara/factsht_toxocara.htm

Vázquez O, Campos T, López N, Martínez I, Romero R. Neumonía eosinofílica secundaria a larva migrans visceral en un niño. Rev Mex Patol Clin. 2001; 48 (3): 156-60.

Worley G, Green J; Frothingham T; Sturmer R; Walls K; Pakainis V, Ellis G. *Toxocara canis* Infection: Clinical and Epidemiological Associations with Seropositivity in Kindergarten Children. J Infect Dis. 1984; 148(4):591-97

Wright K. The Nematode's Cuticle-its surface and the epidermis: function, homology, analogy -a current consensus. J Parasitol. 1987; 73 (6): 1077-83.

Zevallos S. Soil contamination and human Infection by *Toxocara sp.* In the urban area of Lima, Peru. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz-On line. 1998;93(6). Disponible en: <http://memorias.ioc.fiocruz.br/936/index.html>

Zomlefer W. Guide to Flowering Plant Families. USA. The University of North Carolina Press. 1994.