

11661



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

**“Detección del depósito de antígenos de
excreción - secreción de larvas somáticas
de *Toxocara canis* en los tejidos de jerbos con
infección inducida”.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN MICROBIOLOGIA

P R E S E N T A :

M.V.Z. JUAN PABLO MARTINEZ LABAT

ASESOR DE TESIS: DR. FERNANDO ALBA HURTADO

m340623



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: PABLO MARTINEZ
LABAT

FECHA: 4/VII/2004

FIRMA: Pablo Martínez Labat

AGRADECIMIENTOS:

**AL DR. FERNANDO ALBA HURTADO POR EL APOYO PARA
DESARROLLAR ESTE TRABAJO.**

**AL MI COMPAÑERO DE BATALLAR EN EL LABORATORIO DE LA UNIDAD
MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACION EN SANIDAD ANIMAL,
ALEJANDRO BUENDIA, POR TODAS LAS JORNADAS QUE COMPARTIMOS
EN LAS MALAS, LAS BUENAS Y LAS MEJORES, SIN TU APOYO ESTA
COSA HUBIERA SIDO DIFICIL DE COMPLETAR.**

**AL MVZ GERMAN GARRIDO FARIÑA POR SU COLABORACION EN EL
PROCESO HISTOLOGICO Y EL ENTUSIASMO QUE PONE PARA
DESARROLLAR EL TRABAJO.**

**A TODA LA GENTE QUE DE ALGUNA MANERA CONTRIBUYO PARA QUE
ESTE TRABAJO PUDIERA CONCRETARSE.**

DEDICATORIAS.

**A MI ESPOSA CLAUDIA MINERO
Y MIS HIJOS PABLO Y EMILIO,
POR ESE TIEMPO ROBADO
A LA CONVIVENCIA,
SON EL MOTOR DE MI VIDA.**

A MIS PADRES LUCILA † Y PABLO †.

**A MIS HERMANAS:
LUCILA, TERESA, LETICIA Y SOCORRO,
POR TODO EL APOYO Y ENTUSIASMO.**

INDICE

INDICE.....	I
RESUMEN.....	II
ABREVIATURAS EMPLEADAS.....	III
INDICE DE CUADROS Y	
FIGURAS.....	IV, V, VI, VII, VIII, IX, X
INTRODUCCION	

Aspectos epidemiológicos.....	2
Ciclo biológico.....	12
Mecanismos patogénicos.....	15
Los eosinófilos en	
la toxocariosis.....	18
Antígenos del parásito.....	26

HIPOTESIS.....	40
JUSTIFICACION.....	41
OBJETIVOS.....	43
MATERIAL Y METODOS.....	44
Animales.....	44
Obtención de inóculo.....	44
Inoculación de conejos.....	46
Inoculación de jerbos.....	46
Procesamiento histopatológico	
En tejidos de jerbo.....	47
Obtención y mantenimiento de	
Larvas infectantes.....	48
Obtención de antígenos	
Secretores-excretorios.....	49
Ensayo inmunoenzimático.....	50
Electroforesis de proteínas.	
Transferencia de TES.....	51
Western Blot.....	52
Pruebas inmunohistoquímicas.	53

RESULTADOS

Obtención y mantenimiento de	
Larvas infectantes.....	59
Obtención de TES.....	59
Electroforesis de proteínas.	59
Prueba de ELISA.....	59

Western Blot.....	60
-------------------	----

Descripción de lesiones

Macroscópicas y microscópicas

Intestino.....	65
Hígado.....	66
Pulmones.....	69
Riñón.....	73
Cerebro.....	78
Músculo esquelético.....	81
Ojo.....	82
DISCUSION.....	109
CONCLUSIONES.....	118
REFERENCIAS.....	119
APENDICES	
Apéndice 1.....	126
Apéndice 2.....	127
Apéndice 3.....	128
Apéndice 4.....	129
Apéndice 5.....	129
Apéndice 6.....	130

Indice de abreviaturas empleadas.

Antígenos de excreción-secreción.....	TES
Antígeno se secreción de 120 kilodaltones.....	TES-120
Antígeno se secreción de 400 kilodaltones.....	TES-400
Células asesinas inespecíficas.....	NK
3'diaminobenzidina.....	DAB
Ensayo inmunoenzimático.....	ELISA
Factor de crecimiento tumoral beta.....	TGFβ
Factor de necrosis tumoral alfa.....	TNFα
Días postinoculación.....	d.p.i.
Grados centígrados.....	°C
Hematoxilina-eosina.....	HE
Hemoaglutinación Indirecta.....	HAI
Interferon gama.....	INFγ
Inmunoglobulina E.....	IgE
Inmunoglobulina G.....	IgG
Interleucina uno.....	IL-1
Interleucina 3.....	IL-3
Interleucina 4.....	IL-4
Interleucina 5.....	IL-5
Interleucina 6.....	IL-6
Interleucina 10.....	IL-10
Lectina uno de <i>Toxocara canis</i>	TCL-1
Lectina dos de <i>Toxocara canis</i>	TCL-2
Lectina tres de <i>Toxocara canis</i>	TCL-3
Lectina cuatro de <i>Toxocara canis</i>	TCL-4
Larva dos pasivas.....	L2
Linfocitos dobles negativos.....	CD4- CD8-
Linfocito T helper 2.....	Th2
Linfocito T helper 1.....	Th1
Microlitros.....	μl
Milímetro.....	mm.
Microprecipitación.....	MP
Ouchterlony.....	O
Procesamiento por Técnica Inmunohistoquímica.....	PTI
Porcentaje.....	%
Síndrome de larva migrans visceral.....	SLMV
Síndrome de larva migrans ocular.....	SLMO
Solución de buffer de fosfatos.....	PBS
Solución de buffer tris tween.....	TBS-T

INDICE DE FIGURAS Y CUADROS.

Cuadro número 1.-Frecuencia de presentación de formas adultas <i>Toxocara canis</i> en perros de diversas localidades del mundo.....	3
Cuadro número 2.- Frecuencia de formas adultas de <i>Toxocara canis</i> en perros de diferentes localidades de México.....	4
Cuadro número 3.-Frecuencia de portadores humanos de anticuerpos anti- <i>Toxocara canis</i> en diferentes partes del mundo.....	5
Figura 1.- Fases adultas del nematodo <i>Toxocara canis</i>	2
Figura número 2.-Segundo estado larvario de <i>Toxocara canis</i>	27
Figura número 3.- Porción del cuerpo de una L2 de <i>Toxocara canis</i> . en la que se puede observar La cutícula y epicutícula.....	28
Figura Número 4.- Patrón de antígenos identificado originalmente po humanos (De Savigny,1975).....	30
Figura número 5.- Bandas de antígenos secretores y excretores de <i>Toxocara canis</i> detectados por medio de la técnica de Western Blot en sueros de niños asmáticos y sanos positivos en prueba de ELISA-IgG (Muñoz , 2003).....	31
Figura Número 6.- Separación de TES por electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida teñidos por la técnica de Nitrato de Plata.....	61
Gráfica 1.- Cinética de producción de anticuerpos circulantes detectados por ELISA contra TES de larvas de <i>Toxocara canis</i>	62
Cuadro Número 5.- Promedio de los valores de absorbancia detectados por ELISA empleando TES y sueros de conejos infectados experimentalmente con 5,000 huevos larvados de <i>Toxocara canis</i>	63

Figura Número 7.- Bandas reconocidas por el suero de conejos inoculados con 5,000 huevos larvados de <i>Toxocara canis</i> en los diferentes períodos.....	64
Figura 8.-Lesiones en intestino de un animal sacrificado a los 2 días postinfección (d.p.i.).....	83
Figura 9.-Corte sagital del ciego de un jerbo sacrificado 2 d.p.i. (PTI),10X).....	83
Figura 10.- Corte sagital de ciego a mayor aumento (PTI,40X).....	83
Figura 11.- Corresponde a la capa muscular del intestino de un jerbo sacrificado a los 5 d.p.i en el que se observa una larva marcada (PTI,40X).....	83
Figura 12.- Corte de intestino control del tejido de la fotografía número 10.....	85
Figura 13.- Hígado de jerbo sacrificado a los 50 d.p.i (PTI, 10X).....	85
Figura 14.- Lesión granulomatosa en la zona adyacente a la cápsula hepática (PTI, 10X).....	85
Figura 15.- Larva solitaria en el parénquima hepático situada a la vanguardia de un infiltrado inflamatorio (PTI,10X).....	85
Figura 16.- Vista amplificada del organismo observado en la fotografía 15, en el que puede constatarse el grado de difusión de los TES en el tejido(PTI,40X).....	87
Figura 17.- Hígado de un jerbo sacrificado a los 5 d.p.i., con respuesta inflamatoria a la presencia de una larva (PTI, 10X).....	87
Figura 18.- Infiltrado inflamatorio en el hígado de un animal sacrificado 15 d.p.i.(PTI, 10X).....	87
Figura 19.- Hígado de un animal sacrificado a los 40 d.p.i, con un granuloma estructurado (HE, 10X).....	87
Figura 20.- Corresponde a una vista ampliada de un control (control PTI, 40X).....	89

Figura 21.- Pulmón de gerbo sacrificado 5 d.p.i. con hemorragias multifocales.....	89
Figura 22.- Púlmon de jerbo sacrificado a los 5 d.p.i. con imagen de bronquiolo necrótico (HE, 10X).....	89
Figura 23.- Pulmón de jerbo sacrificado a los 20 d.p.i. con presencia de cuadro neumónico intersticial (PTI,10X).....	89
Figura 24.- Tejido pulmonar de un jerbo sacrificado a los 25 d.p.i., con lesiones granulomatosas peribronquiales y perivasculares focales en las que se observa el infiltrado eosinofílico observado en la mayoría de los cortes (HE,100X).....	91
Figura 25.- Tejido pulmonar de jerbo sacrificado 20 d.p.i., con lesiones granulomatosas peribronquiales y perivasculares.....	91
Figura 26.- Amplificación de la fotografía 26 (PTI, 40X).....	91
Figura 27.- Tejido pulmonar de jerbo sacrificado el día 30 d.p.i., con cuadro neumónico intersticial(4X).....	91
Figura 28.- Tejido pulmonar de jerbo sacrificado el día 40 d.p.i., con foco granulomatoso peribronquial y perivascular (HE, 4X).....	93
Figura 29.- Tejido pulmonar de jerbo sacrificado el día 40 postinfección, con lesión crónica central (PTI, 4X).....	93
Figura 30.- Tejido pulmonar de jerbo sacrificado el día 45 postinoculación con respuesta inflamatoria crónica(PTI, 4X).....	93
Figura 31.- Amplificación de la lesión descrita en la fotografía número 29 (PTI,10X).....	93
Figura 32.- Riñón de jerbo sacrificado 40 d.p.i. de inoculación con focos granulomatosos de tamaño variable.....	95

Figura 33.- Riñón de jerbo sacrificado 5 d.p.i. con foco granulomatoso (HE, 10X).....	95
Figura 34.- Tejido renal un jerbo sacrificado a los 10 d.p.i. con zona necrótica periférica a una larva (HE, 4X).....	95
Figura 35.- Amplificación de la figura 35 (PTI, 40X).....	95
Figura 36.- Tejido renal con alteraciones inflamatorias y TES infiltrados (PTI, 4X).....	97
Figura 37.- Tejido renal de jerbo sacrificado a los 10 d.p.i., con reacción inflamatoria intersticial (PTI, 10X).....	97
Figura 38.- Tejido renal de jerbo sacrificado a los 20 d.p.i., con foco de inflamación granulomatosa (4X).....	97
Figura 39.- Tejido renal de jerbo sacrificado 20 d.p.i. procesamiento inmunohistoquímico con dos cortes transversales de una larva (PTI, 10X).....	97
Figura 40.- Tejido renal de jerbo sacrificado 20 d.p.i. con una larva bajo la cápsula (PTI, 20X).....	99
Figura 41.- Riñón de jerbo sacrificado 55 d.p.i., corresponde a la cápsula renal con una reacción inflamatoria (HE, 4X).....	99
Figura 42.- Riñón de jerbo sacrificado 40 d.p.i., con foco de respuesta granulomatosa asociada a una larva (PTI, 10X).....	99
Figura 43.- Riñón de jerbo sacrificado 45 d.p.i., con granuloma subcapsular PTI, 4X).....	99
Figura 44.- Riñón de jerbo sacrificado 55 d.p.i., en él se observa un granuloma típico ubicado bajo la cápsula, sin presencia de larvas (HE, 4X).....	101
Figura 45.- Riñón de jerbo sacrificado a los 60 d.p.i. con un piogranuloma que envuelve a una larva (PTI, 10X).....	101

Figura 46.- Riñón de jерbo sacrificado a los 40 d.p.i. , con ampliación de la lesión presentada en la figura 44 (control PTI, 40X).....	101
Figura 47.-Tejido muscular esquelético de jерbo sacrificado 30 d.p.i., con una larva de reciente ingreso (PTI, 40X).....	101
Figura 48.-Tejido muscular esquelético de un jерbo sacrificado 40 d.p.i., con foco inflamatorio (PTI, 20X).....	103
Figura 49.-Tejido muscular esquelético de un jерbo sacrificado 50 d.p.i., con granuloma bien delimitado. (PTI, 10X).....	103
Figura 50.- Tejido muscular esquelético de jерbo sacrificado 50 d.p.i. con granuloma a mayor magnificación y presencia de larva en su interior (PTI, 20X).....	103
Figura 51.- Imagen control de la figura 51 mismo tejido incubación con el suero de conejo infectado (20X).....	103
Figura 52.- Cerebro de un jерbo sacrificado 10 d.p.i. con larva cortada en su longitud (PTI, 10X).....	106
Figura 53.- Cerebro de un jерbo sacrificado 10 d.p.i., con porciones del cuerpo de una larva cortados transversalmente (PTI, 20X).....	106
Figura 54.- Cerebro de un jерbo sacrificado 25 d.p.i., con dos porciones de larva cortadas transversalmente (P.T.I. 40X).....	106
Figura 55.- Cerebro de un jерbo sacrificado 40 d.p.i., con porciones del cuerpo de una larva (PTI, 40X).....	106
Figura 56.- Cerebro de un jерbo sacrificado 20 d.p.i. con s fragmentos de una larva cortados transversalmente (PTI, 20X).....	108
Figura 57.- Cerebro de un jерbo sacrificado 45 d.p.i., con una gran concentración de TES (PTI, 20X).....	108

Figura 58.- Cerebro de un jerbo sacrificado 45 d.p.i., con una porción del cuerpo de una larva situada en la periferia de un vaso sanguíneo distorsionado (P.T.I., 40X)..... 108

Figura 59.- Cerebro de un jerbo sacrificado 45 d.p.i., control de prueba, (control PTI, 20X)..... 108

RESUMEN.

El objetivo del trabajo fue correlacionar la presencia de antígenos de secreción-excreción (TES) de larvas somáticas de *Toxocara canis* con las lesiones inducidas en una infección experimental.

Se obtuvo un suero anti TES usado como anticuerpo primario en pruebas inmunohistoquímicas, inoculando 5 conejos Nueva Zelanda de tres meses de edad con 5,000 huevos larvados de *T. canis*, sangrando a los animales los días 0, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85 y 127 postinoculación. Los títulos de anticuerpos contra TES se determinaron con una prueba de ELISA, detectándose desde el día 8, y la máxima concentración el día 71, manteniéndose constantes. El suero fue evaluado para detectar TES con la técnica de Western Blot encontrándose reconocimiento secuencial de bandas de 32, 35, 45, 55, 66, 120 y 400 kDa concordando con las descripciones de diferentes autores.

Para detectar los antígenos en los tejidos se inocularon 70 jerbos machos de tres meses con 1,000 huevos larvados de *T. canis* aproximadamente, sacrificando grupos de cinco animales los días 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 y 65 p.i.. Se extrajeron : intestino, hígado, pulmones, riñones, cerebro y músculo esquelético procesándolos por inmunohistoquímica , se hicieron 5 cortes histológicos de cada muestra, uno procesado por la técnica de hematoxilina-eosina como referencia, en tres se hizo inmunohistoquímica y el restante fue dejado como control negativo. Se observaron lesiones típicas asociadas a presencia y migración de larvas , el marcaje de los antígenos dentro, sobre el cuerpo y su difusión en los tejidos lesionados, encontrándose la asociación larva-TES y el marcaje de TES sin larvas, indicando que existe una relación entre las alteraciones producidas por la interacción física larva-tejido-TES con la presencia y dimensión de las lesiones.

INTRODUCCIÓN

Toxocara canis es un nematodo cuya fase adulta habita en el intestino delgado de perros domésticos jóvenes y el de algunos cánidos salvajes en los que causa la enfermedad llamada toxocariosis. La larva dos (L2) puede vivir en las vísceras y tejido muscular de hospedadores paraténicos, entre los que se encuentran los humanos. En estos últimos, *T. canis* se ha asociado junto con otros géneros de nematodos a la producción de enfermedades como el síndrome de larva migrans visceral y síndrome de larva migrans ocular. (Smith, 1953; Nichols, 1956; Criado et al., 2000, Robertson et al.; 2000, Oliveira et al.; 2002, Fisher, 2003; Nunes et al, 2003).

La forma intestinal puede tener diferentes tipos de comportamiento pudiendo presentarse de forma subclínica, en la que la carga parasitaria es reducida repercutiendo en el estado nutricional, en tanto que las infecciones numerosas pueden causar serios trastornos que ponen en riesgo la vida del animal, ya sea durante su desplazamiento por los pulmones o bien al asentarse en el intestino por provocar obstrucciones, ruptura de la pared intestinal o invadir otros órganos en la vecindad del intestino. La forma extraintestinal generalmente transcurre como un evento con pocas manifestaciones clínicas por darse el asentamiento de cantidades relativamente reducidas de larvas que, sin embargo se mantienen viables e interactivas con los tejidos, causando procesos inflamatorios crónicos que afectan la condición de vida del hospedero por el resto de sus días, las infecciones masivas eventualmente causan la muerte de los hospederos que las adquieren. Debido a la

capacidad de sobrevivir en el hospedero y la persistencia de sus efectos resultan de mayor importancia las fases larvarias que las adultas (Rubel et al, 2003).

Aspectos epidemiológicos.

La infección por este parásito está ampliamente difundida resultando uno de los parásitos más comunes en el perro, lo cual se demuestra con la gran cantidad de estudios existentes tanto a nivel nacional como internacional en los que se observan variaciones muy importantes de frecuencia que van del 2.9 en Holanda al 79.9% en Japón, algunos de estos datos se presentan en el cuadro 1 a nivel mundial comprendiendo el período de 1955 a 1998 y en el cuadro 2 se presentan los datos de estudios nacionales en los que se observan fluctuaciones que van del 5% en Monterrey al 100% en el D.F. comprendiendo también el período de 1955 a 1998 (Alba, 1999).

Los perros jóvenes de menos de doce semanas son los principales portadores de las fases adultas, en la figura 1 se observa el aspecto que presentan estos gusanos. Estos parásitos desaparecen gradualmente hasta que los animales quedan libres de ellos, las frecuencias de presentación fluctúan entre un 10 y un 100%, siendo poco común que perros adultos sean portadores de estas fases (se considera que entre 15 y 20% lo son) (Alba, 1999).

Los animales portadores de fases adultas eliminan huevos del parásito por varios meses. Las hembras llegan a

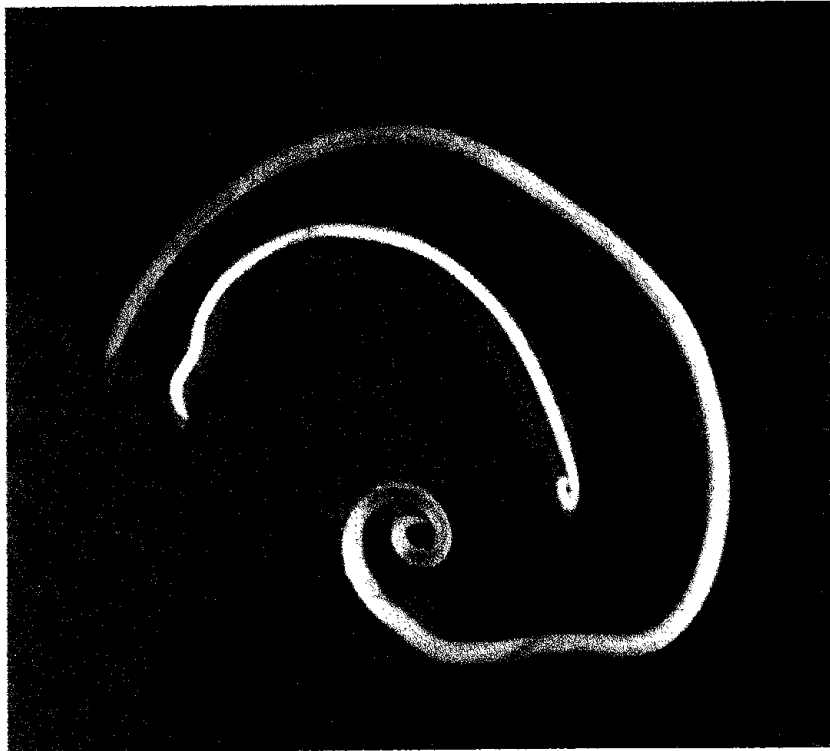


Figura Número 1.-Fases adultas de *Toxocara canis*, al centro y de dimensión reducida el macho, al exterior y de mayores dimensiones la hembra.

producir hasta 200,000 huevos al día, los cuales son eliminados en la materia fecal. En el medio externo, esas fases liberadas tienen altas oportunidades de dar origen a las L2 pasivas que son las fases infectantes, las cuales dependen de factores medio-ambientales para desarrollarse y mantenerse viables en el suelo (pisos de tierra, pisos empastados, sombreados y húmedos). Por lo anterior, en algunos lugares propicios se pueden concentrar miles de fases infectantes en espacios reducidos estableciendo así la posibilidad de que nuevos animales desarrollen la infección. El rápido desarrollo del parásito durante la fase de lactancia permite que esas fases que se forman a las cinco o seis semanas de vida ingresen al cuerpo de las

FRECUENCIA DE PRESENTACION DE FORMAS ADULTAS DE
Toxocara canis EN PERROS DE DIVERSAS LOCALIDADES
DEL MUNDO

LUGAR	AÑO	NO. ANIMALES REVISADOS	TIPO DE EXAMEN	FRECUENCIA	AUTOR
Canadá	1975	239	CPS	43.50%	Seah et al., 1975
Accra, Ghana	1975	100	N	40	Anteson y Corkish, 1975
Londres, Inglaterra	1977	1000	CPS	7.2	Turner y Pegg, 1975
Iowa, EUA	1978	33,594	CPS	3	Lightner L., 1978
Pretoria, Sudafrica	1979	253	N	32	Verster, 1979
Bangkok, Thailandia	1980	107	CPS	6.5	Hinz, 1980
Praga, Checoslovaquia	1982	500	CPS	4.2	Valkounova, 1982
Sabah, Malasia	1984	175	CPS	81	Mac Adam et al., 1984
Freetown, Siera Leona	1984	2,938	CPS	9	Hassan, 1984
Hessian Neckar, Alemania	1985	155	CPS	5.8	Hinz y Blatz, 1985
Calabar, Nigeria	1985	254	CPS	26.7	Ugochukwu y Ejimadu, 1985
Bagdad, Irak	1986	20	N	40	Tarish et al., 1985
La Plata, Argentina	1988	2,895	CPS	14.2	Venturini y Radman, 1988
Curazao	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
Bélgica	1991	2,324	CPS	17.4	Vanparijs et al., 1989
Chinamoa, Zimbawe	1991	42	N	9	Owolo et al., 1991
Ankara, Turquía	1992	269	CPS	26	Zeybek et al., 1992
Montenegro, Yugoslavia	1992	15	N	30	Katic y Popovic, 1992
Nairobi, Kenia	1993	156	N	3	Wachira et al., 1993
Oklahoma St., USA	1993	21,583	CPS	4	Jordan, et al., 1993
Hannover, Alemania	1993	3,329	CPS	6.9	Epe et al., 1993
Melbourne, Australia	1993	493	CPS	17.4	Jhonston y Gasser, 1993
Dublín, Irlanda	1994	350	CPS	82.6	O'Larcain P., 1994 b
Sao Paulo, Brasil	1995	314	CPS	16.6	Farias et al., 1995
Ibaraki, Japón	1997	916	N	79.9	Saeki et al., 1997
Amsterdam, Holanda	1997	272	CPS	2.9	Overgauv, 1997
Taipei, Taiwan	1997	96	N	27	Fei-Chang y Mo- Kang, 1997

N-NECROPSIA CPS-COPROPARASITOSCOPICO .

(Tomado de Alba, 1999)

CUADRO 2
 FRECUENCIA DE FORMAS ADULTAS DE *Toxocara canis* EN
 PERROS DE DIFERENTES LOCALIDADES DE MEXICO.

LUGAR	AÑO	PERROS	TIPO DE	FRECUENCIA	AUTOR
		EXAMINADOS	EXAMEN		
México D.F.	1955	100	N	30	Flores, 1955
México D.F.	1967	120	CPS	93	Quiroz, 1982
México D.F.	1969	50	CPS	20	Escalante, 1960
Veracruz, Ver	1970	300	CPS	9.6	Franyutti, 1970
Monterrey, N.L.	1972	100	N	5	Garza, 1972
Guadalajara, Jal.	1973	450	CPS	16.2	Mora de la, 1973
Cuernavaca, Mor.	1974	719	CPS	15	Quiroz, 1982
Aguascalientes, Ags.	1983	294	CPS	47.6	Valdivia <i>et al.</i> , 1983
México D.F.	1986	200	CPS	21	Cruz y col, 1987
México D.F.	1987	176	N	58.5	Cruz y col, 1987
Pungarabato y					
Cutzamala, Gro.	1989	106	CPS	37.7	Barrera y Fragoso, 1989
Veracruz, Ver	1989	447	CPS	74.0	Zermeño y col., 1986
México D.F.	1990	463	CPS	4.9	Cruz y col, 1987
México D.F.	1992	240	CPS	3.6	Penagos y col., 1992
Culiacan, Sin.	1996	100	CPS	7	Gaxiola y col., 1996
México D.F.	1996	47	CPS	100	Vega y Rivera, 1996
México D.F.	1998	100	N	15	Martínez y Col, 1998
México D.F.	1998	470	CPS	19.8	Eguia-Aguilar, 1998

N-NECROPSIA CPS-COPROPARASITOSCÓPICO. (Malloy y Embil, 1978, tomado de Alba, 1999, Hofkin, 2001, Ninnar *et al.*, 2002, Habluetzel, 2003)

perras debido al proceso de socialización que tienen entre sí cachorros y perras, por lo cual si las perras transmitieron larvas infectantes durante la gestación y lactancia a sus cachorros, la producción de huevos y desarrollo posterior de L2 hacen que la perra recupere parte de las larvas que ha liberado en esos lapsos (Schacher, 1957; Malloy y Embil, 1978; Oliveira *et al.*, 2002).

Portadores de fases adultas.

Las poblaciones de perros portadores de parásitos adultos pueden ser divididas en varios grupos: uno de ellos está representado por aquellos animales con dueño, susceptibles de portar parásitos, que, sin embargo, son sometidos a desparasitación y, aunque sea de forma parcial son controlados y tienen poco impacto por el grado de parasitismo que presentan y la forma en que éste se mantiene. Parte de esa población es desparasitada una sola vez en su vida y dándole más importancia al aspecto de vacunación para prevenir enfermedades zoonóticas (Bishop et al., 2000).

Otro sector corresponde a los animales que se mantienen en la calle y son adoptados por la comunidad de perros que se mantienen en la calle y son adoptados por la comunidad de vecinos de esta, son adoptados pero mantenidos en la calle sin que exista responsabilidad de la gente en cuanto a desparasitarlos o aplicarles vacunación preventiva, este sector es un riesgo de contaminación al no existir control sanitario ni reproductivo ya que producen camadas que a su vez integran el tercer grupo: el de los perros callejeros, animales sin ningún tipo de control que subsisten a partir de desechos comestibles que les sirven como alimento, con un tremendo potencial reproductivo. Estos dos estratos de la población canina son los responsables de contaminar calles, jardines públicos, camellones, etc., estableciendo un ciclo de transmisión constante en la que los cachorros portan las fases adultas contaminando el suelo y las perras en

particular se reinfectan a partir de fases infectantes derivadas de los cachorros. Además, los perros jóvenes pueden infectarse a partir de la ingestión de huevos larvados que contaminan el suelo y por la ingestión de cuerpos o partes de hospederos paraténicos como rumiantes o roedores, que alojan L2's enquistadas. (Tominura et al., 1976; Ciarmela et al., 2002).

Toxocariosis en hospederos paraténicos.

Los perros adultos se comportan frente a este parásito con un papel doble ya que se considera que un cierto porcentaje de la población de estos animales se mantiene permanentemente susceptible a la infección intestinal, que ocurre regularmente en perros jóvenes, pero además, funcionan como hospederos paraténicos, resultando frecuente esta modalidad en la perra que tiene el papel más relevante dado que al mantener enquistadas las L2's en su cuerpo por periodos muy prolongados (años), transmite lactogénica y transplacentariamente las larvas infectantes a los cachorros. El proceso de activación de las larvas de la madre a su camada es un fenómeno que ocurre de forma gradual, por lo que solo una parte de las larvas son activadas y liberadas durante cada gestación y lactancia, siendo, probablemente las primeras gestaciones las que originen las infecciones más severas en los cachorros. Agravándose esto si se dejan pasar varios años sin que las perras sean cubiertas, ya que los animales pueden estarse infectando a partir de L2's depositadas en el suelo, las cuales contaminan el cuerpo y se facilita su ingestión, este proceso podría ser cortado estableciendo un

programa de desparasitación que incluya el uso de principios activos capaces de matar a las larvas enquistadas en el cuerpo de las perras. También y de una forma que no ha sido bien evaluada, existe la probabilidad de que los animales adultos ingieran L2's al consumir hospederos paraténicos (roedores) o porciones de sus cuerpos (vísceras, tejido muscular de animales grandes). Por esta razón la carga parasitaria por concepto de larvas, es una constante que en las hembras puede sufrir variaciones asociadas a las gestaciones y lactancias, en tanto que en los machos adultos no existen esas opciones y las larvas se acumulan en su cuerpo alterando el estado de salud de éstos (Kayes y Adams; 1976; Lee y Shu, 1976; Burke y Roberson, 1983; Oliveira et al., 2002).

Se ha encontrado en roedores la presencia de casos de resistencia innata a la infección por larvas de *Toxocara canis* asociada a sus características genéticas, lo cual origina alta susceptibilidad o resistencia a la infección por los estadios larvarios en función a esta característica (Shehada y Herbert, 1989).

La presencia de las larvas ocasiona trastornos inflamatorios crónicos en tejido muscular y cerebral que altera la calidad de vida del animal, sin dejar de lado que involucran prácticamente todas las vísceras en su desplazamiento antes de asentarse definitivamente, dejan tejidos lesionados y cicatrizados a su paso en especial: el hígado, pulmones y los riñones. Eventualmente los ojos pero sobre todo el tejido muscular y el cerebro presentan las mayores concentraciones y persistencia. De forma general el parasitismo en los animales adultos no es aparente, pero su

presencia afecta la condición de vida y el funcionamiento de diversos órganos lo cual puede finalmente acortar su longevidad. Por esta razón es importante desarrollar esquemas de tratamiento contra *T. canis* que incluyan principios capaces de destruir las fases larvarias en los tejidos de los hospederos paraténicos (Bardon et al., 1994; Helgwich et al., 1999; Payne et al., 2000; Somerfelt et al., 2001)..

El humano y la toxocariosis.

Los humanos actúan como hospederos terminales del parásito, en su cuerpo se alojan las fases larvarias a nivel de vísceras y musculatura esquelética, las cuales ingresan al ser ingeridas sobre todo por contaminación de las manos, su presencia puede ser más frecuente en los niños durante los primeros años de vida, con frecuencia asociándose a apetito pervertido, debido al comportamiento durante el juego ya que la mayor parte del tiempo esa actividad es desarrollada en el suelo (se ha demostrado que del 13 al 92% de los areneros en jardines públicos de algunos países están contaminados con huevos larvados del parásito), entrando en contacto con la tierra potencialmente contaminada pudiendo originar la infección, esta regularmente se desarrolla de forma gradual y resulta inaparente (se conoce como toxocariosis encubierta) y la otra condición corresponde a la ingestión de una gran cantidad de fases infectantes produciendo una condición aguda y potencialmente mortal. Esta es denominada síndrome de larva migrans visceral (también denominada eosinofilia tropical o síndrome de Loeffler) y existe además una

variante asociada con el asentamiento de larvas en los ojos, la cual ocurre aleatoriamente y se denomina síndrome de larva *migrans* ocular. La presencia de la infección en humanos esta ampliamente documentada en el mundo con niveles de prevalencia muy variados, pueden verse en el cuadro 3 los datos obtenidos por diversos autores en estudios en la población humana con resultados que van desde 2.6% en Inglaterra hasta 81.5% en Nepal. Lamentablemente al no ser una enfermedad de reporte obligatorio se conoce poco de su frecuencia en términos generales por ser subestimada. La infección afecta la calidad de vida del humano y puede asociarse eventualmente a la presentación de problemas respiratorios crónicos, hepáticos o neurológicos y si se considera que se adquiere durante la infancia, acompaña al individuo durante el resto de la vida (Smith, 1953; Nichols, 1956; Gordon, 1984, Lynch et al.; 1993, Abunnabi, 2000; Robertson et al., 2000; Bernardino et al., 2001; Fisher, 2003).

La presencia y comportamiento de este parasitismo han sido influidos por aspectos de tipo social y económico, relacionados por ejemplo, con las características y dimensiones de las casas habitación en el estrato de clase media y en las áreas en que vive este sector de la población, así como en las zonas periurbanas en las que se ha incrementado la construcción de gran número de casas de reducidas dimensiones en las que se asientan las familias con sus mascotas, lo cual lleva a que los perros tiendan a establecer una importante relación con el medio externo permaneciendo en fuera de las casas muchas veces o bien la

CUADRO 3
 FRECUENCIA DE PORTADORES HUMANOS DE ANTICUERPOS
 ANTI-*Toxocara canis* EN DIFERENTES PARTES DEL
 MUNDO.

AREA	AÑO	NUMERO DE MUESTRAS	TIPO DE EXAMEN	FRECUENCIA %	AUTOR
Alemania Occidental	1977	2864	MP	8.6	Preissshorfen y Lamina, 1977
Inglaterra	1979	922	ELISA	2.6	De Savigni, 1979
Pennsylvania, EUA	1980	47	ELISA	54	Jones <i>et al.</i> , 1980
Alemania Occidental	1980	4656	O	15.1	Lamina, 1980
Estados Unidos	1984	333	ELISA	21.1	Worley <i>et al.</i> , 1984
Zurich, Suiza	1986	665	ELISA	5.1	Sturchler <i>et al.</i> , 1986
Camberra, Australia	1986	660	ELISA	7	Nicholas <i>et al.</i> , 1986
Suecia	1989	323	ELISA	7	Ljungstrom y Van-Knapen, 1989
Barcelona, España	1989	1,018	ELISA	3.6	Portus <i>et al.</i> , 1989
Bogotá, Colombia	1990	207	ELISA	43.6	Agudelo <i>et al.</i> , 1990
Italia	1990	2,583	ELISA	3.9	Genchi <i>et al.</i> , 1990
Sao Paulo, Brasil	1990	2,025	ELISA	3.6	Chieffi <i>et al.</i> , 1990
Baku, Rusia	1990	4,765	HAI	12.5	Chovanov <i>et al.</i> , 1990
Dublín, Irlanda	1991	140	ELISA	52.1	Holland, 1990
Brasil	1991	54	ELISA	40	Virginia <i>et al.</i> , 1991
Jordania	1992	699	ELISA	10.9	Abo-Shehada <i>et al.</i> , 1992
Kuala Lumpur, Malasia	1993	331	ELISA	19.6	Hakim <i>et al.</i> , 1993
Rep. Eslovaca	1993	908	ELISA	13.6	Havasiova <i>et al.</i> , 1993
Ball, Indonesia	1993	190	ELISA	63.2	Chomel <i>et al.</i> , 1993
Loire Atlantique, Francia	1994	1,836	ELISA	22	Gueglio <i>et al.</i> , 1994
Dublín, Irlanda	1995	2,129	ELISA	3.1	Holland, 1995
Katmandu, Nepal	1996	200	ELISA	81.5	Rai <i>et al.</i> , 1996
País Vasco, España	1996	455	ELISA	3.1	Cilia <i>et al.</i> , 1996
Islas Canarias, España	1997	14,074	ELISA	3.4	Jimenez <i>et al.</i> , 1997

ELISA-Ensayo inmunoenzimático.

(Tomado de Alba, 1999)

HAI-Hemoaglutinación indirecta.

O-Ouchterlony.

MP-Microprecipitación.

misma gente los saca una o más veces en el día lo cual es aprovechado por los animales para defecar y generar algún nivel de contaminación (Worley et al.; 1984, Asao et al.; 1993, Lynch et al.; 1993, Oliveira et al., 2002).

Ciclo biológico de *Toxocara canis*.

El ciclo presenta variantes de acuerdo con el tipo de hospedero, la edad y el estado reproductivo. En este contexto, cabría esperar un comportamiento diferente en perros jóvenes (de menos de 12 semanas), en perros adultos, en hembras gestantes o individuos de especies diferentes que funcionan como hospederos paraténicos como; roedores, rumiantes, etc..

En los perros de menos de doce semanas de edad, el desarrollo es similar al de otros ascáridos. En estos, los huevos con L2 son ingeridos, la larva eclosiona en intestino delgado y migran a través de su pared hasta los vasos sanguíneos. Por vía sanguínea llegan al hígado, víscera que atraviesan para poder salir nuevamente por sangre, alcanzan con gran rapidez el corazón y se integran por la circulación venosa a los pulmones, en los que inicialmente se establecen en el parénquima pulmonar para mudar y convertirse en el tercer estadio larvario. La larva 3 migra en forma ascendente a bronquiolos, bronquios, tráquea y finalmente a faringe donde son deglutidas. En estómago e intestino delgado mudan al cuarto y quinto estadio larvario. Finalmente, se producen formas adultas maduras a las 4 semanas, comenzando la eliminación de huevos y permaneciendo en esta zona por varios meses antes

de ser expulsados por el hospedero (Greve, 1971; Fan et al., 2002).

En los hospederos paraténicos (perros de más de doce semanas, animales distintos al perro y seres humanos) la infección puede darse por ingestión de huevos infectantes dentro o por la de larvas enquistadas en el cuerpo de otros hospederos paraténicos. Después de su ingestión las larvas eclosionan del huevo o son liberadas de los tejidos infectados al ser digeridos. Las larvas liberadas atraviesan la pared intestinal, migran hacia las venas mesentéricas y de aquí son arrastradas a los pulmones pero en lugar de mudar se mantienen como segundo estado larvario que no tiene migración traqueal sino que regresa a sangre venosa para llegar al corazón y ser dispersada a todo el organismo. Estas larvas tienden a concentrarse en dos sitios del cuerpo: el cerebro y la musculatura esquelética. En esos tejidos, las larvas son incapaces a este nivel de continuar con su desarrollo produciéndose el fenómeno de arresto larvario quedando estacionadas y aisladas por respuestas inflamatorias para formar un quiste (a nivel de musculatura esquelética), en estas localizaciones las larvas pueden mantenerse viables por lapsos de varios años, se ha encontrado que el patrón migratorio y de dispersión puede ser afectado por el tamaño de la dosis de inóculo que ingresa a este tipo de hospederos, además hay evidencias de que se trata de un fenómeno independiente de la respuesta inmune asociada a infecciones previas en los animales (Greve, 1971; Kayes y Adams, 1976; Fox y Kassai, 1998; Helgwich et al., 1999).

En hembras las hormonas de la gestación provocan que las larvas se reactiven durante el segundo tercio de la gestación, pasando a los fetos a través de la placenta. Las

larvas se mantienen en el hígado del feto hasta el nacimiento. Al nacer los cachorros las larvas migran del hígado a los pulmones por vía sanguínea repitiendo el comportamiento de aquellas larvas que han ingresado por la vía oral. El período de prepatencia es menor, ya que estas fases han ahorrado tiempo en desplazamiento, lo cual les permite un rápido acceso al aparato digestivo madurando en un lapso corto (menor de 15 días). También, por factores hormonales las larvas reactivadas pasan a glándula mamaria y salen por leche o calostro, pasando por vía oral a los cachorros en donde se desarrolla una migración convencional de ascárido.

La activación de las larvas somáticas durante la gestación o lactancia reduce la concentración de estas en el cuerpo de la perra. Se ha observado que la activación de las larvas ocurre de forma gradual y aún cuando las perras no se reinfecten pueden estar transfiriéndolas durante cuatro o cinco gestaciones y lactancias, pudiendo darse su máximo de concentración durante su primera gestación. La migración transplacentaria ha sido descrita también en ratones, la cual permite la diseminación de larvas que se enquistan en el cuerpo de otros hospederos paraténicos, favoreciendo su diseminación en la naturaleza e incrementando el riesgo de transmisión en poblaciones caninas en las que la ingesta de roedores es frecuente en medios rurales (Lee et al., 1976).

En los machos adultos a nivel general el comportamiento es el mismo que para cualquier otro hospedero paraténico. Dichos machos se convierten en hospederos terminales, en los que las larvas permanecen inactivas, aunque eventualmente se ha observado la presencia de parásitos adultos en el intestino de este tipo

de animales, lo cual implica que se ha completado la migración y desarrollo del organismo. Este comportamiento permite que entre 10 y 15 % de la población de perros adultos sean portadores de pequeñas cantidades de parásitos. Y que también contribuyan a contaminar el medio ambiente, en los animales que funcionan como hospederos paraténicos se produce un comportamiento semejante al que se presenta en los perros adultos pudiendo quedar como hospederos terminales o, si se da la opción en la naturaleza y esos hospederos llegan a ser ingeridos por perros de menos de 12 semanas dan origen a fases adultas y en el caso de ser consumidos por perros adultos originan larvas enquistadas en el cuerpo de esos individuos (Greve, 1971; Schacher, 1956).

Mecanismos patogénicos.

En las infecciones naturales las alteraciones generadas por estos organismos se agrupan en dos niveles: las producidas por los estados adultos (que pasan por un breve desarrollo larvario en el hospedero) y las producidas por los estadios larvarios (específicamente en los hospederos paraténicos).

En el primer caso debe considerarse una primera fase derivada de la migración a través de la pared intestinal en la que la L2 destruye y digiere las diversas capas de esta estructura, causando hemorragias y una severa respuesta inflamatoria, que permite la reparación posterior de estas lesiones. La segunda etapa se asocia a las lesiones hepáticas derivadas del desplazamiento de las larvas el cual se asocia a la destrucción de tejido. La digestión de los mismos produce severas hemorragias, tanto en el

parénquima como en la cápsula de la víscera, ésta va seguida de una respuesta inflamatoria que rodea las zonas lesionadas y se caracteriza por mantenerse durante largo tiempo después de que los organismos han desaparecido. Las zonas lesionadas pierden por un lapso muy prolongado su capacidad para participar en los proceso metabólicos propios de la víscera, pudiendo resultar esto de importancia cuando se trata de animales jóvenes, por fortuna, esta víscera tiene una gran potencial para reparar y regenerar las zonas lesionadas. La siguiente fase esta relacionada con el daño a nivel pulmonar que se da en dos etapas: la primera ocurre a nivel de parénquima y se relaciona con la destrucción del tejido y su literal digestión por productos de excreción de las larvas, lo cual se asocia con el desarrollo de severas hemorragias, con y la aparición de una violenta respuesta inflamatoria en la que se produce el desarrollo de una reacción granulomatosa que se mantiene por largo tiempo y que afecta notablemente la capacidad respiratoria en caso de existir una infección importante. Continúa con un proceso de reparación con depósito de material cicatrizal que queda como secuela. Este proceso puede ser especialmente importante en animales recién nacidos, ya que puede inducir un proceso neumónico grave y asociarse a infecciones bacterianas oportunistas que agravan el cuadro, pudiendo provocar la muerte. Posteriormente se dirigen a los pasajes respiratorios en donde generan reacciones a cuerpo extraño de forma temporal, para ser expelidas hacia el tubo digestivo, en donde se comportan como organismos quimófagos. Obtienen sus nutrientes del contenido intestinal, afectando la nutrición del hospedero que guarda una relación proporcional con la cantidad de gusanos

variando el impacto. Es poco perceptible cuando se trata de pequeñas cantidades de adultos y, muy ostensible en caso de parasitosis masivas debido al grave detrimento en nutrientes que lleva al adelgazamiento del animal el cual se marca más después de alimentarse dándole un aspecto característico. Esto se complementa con el volumen ocupado por los organismos y la respuesta hipertrófica de la musculatura lisa del intestino, que provoca también aumento del volumen abdominal, en casos extremos de desnutrición el hospedero recurre a la utilización de componentes estructurales, como grasa corporal y proteína de músculo, que serán invertidos en el metabolismo, en especial para mantener los niveles de albúmina plasmática. Que cuando llegan a un punto crítico llevan al desarrollo de ascitis. La interacción física con los vermes provoca también alteraciones en la mucosa intestinal, disminuye la dimensión de las vellosidades apareciendo hiperplasia de la mucosa, con predominio de células indiferenciadas, ésta puede relacionarse con un síndrome de pérdida proteica por permeabilidad aumentada de la mucosa que lleva al desarrollo de hipoproteïnemia y a la pérdida de volumen muscular en el animal. Eventualmente los parásitos se desplazan a estómago y causan el reflejo emético siendo expulsados espontáneamente. En el mismo sentido puede haber suficiente estímulo a nivel intestinal para provocar un aumento de motilidad que permite su expulsión. También de forma esporádica se producen obstrucciones intestinales y migraciones erráticas de consecuencias fatales. La persistencia de los gusanos adultos es por algunos meses y al término se produce su expulsión desapareciendo la infección del animal (Fenoy et al., 2001).

La infección producida por los estadios larvarios sigue un comportamiento dependiente de la cantidad de organismos que ingresan con afección hepática y pulmonar muy parecida en su fase inicial en el que el común denominador es la destrucción tisular, la producción de hemorragias y las secuelas inflamatorias; que se hacen crónicas, muchas de ellas con formación de reacciones granulomatosas con participación de polimorfonucleares (neutrófilos y eosinófilos), macrófagos y linfocitos en los diversos tejidos. La diferencia en este caso es que los daños se extienden a todos los tejidos viscerales (particularmente al cerebro), la musculatura esquelética y aleatoriamente los ojos. En función a la prolongada viabilidad de los organismos la respuesta inflamatoria se mantiene constante e induce el aislamiento y el enquistamiento de las larvas. Este proceso tiene una evolución caracterizada por la presencia de una marcada eosinofilia con valores de hasta el 50% (Kayes y Adams, 1976; Parsons et al., Buendía ; 2000, Fenoy, 2001; Oktar et al., 2002; Chia-Kwung et al., 2003; Akao et al.; 2003, Nobuaki et al., 2003).

Los eosinófilos en la toxocariosis.

En relación con la eosinofilia y la toxocariosis, existen estudios, con los que se ha profundizado en la dinámica de su desarrollo y el impacto que produce su mantenimiento en los tejidos, el proceso primariamente se relaciona con los antígenos de secreción excreción (TES) de las larvas, que son los responsables de la inducción de la respuesta inmune. La elevada densidad de eosinófilos en la respuesta inflamatoria asociada al parásito, es relevante

en la evolución del proceso patogénico ya que a la luz de los nuevos conocimientos , se ha demostrado que la respuesta inmune contra *Toxocara canis*, es mediada por los linfocitos T2 CD4+ tipo 2 (Th2) con un papel muy importante para las citocinas producidas por esas células (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-3), que trabajan de forma orquestada para generar una respuesta inflamatoria efectiva para contrarrestar la presencia de algunos nematodos, esos productos son importantes para la producción de anticuerpos y tienen actividad represora, aunque hay evidencia de que las respuestas mediadas por linfocitos T1 CD4+ Th1, pueden ser reguladas de forma cruzada por las citocinas producidas por las células Th2 que actualmente se ha observado, son también producidas por otras células y, tienen participación en esta respuesta y el mismo fenómeno puede ocurrir en sentido inverso (Sher, 1995).

La IL-4, induce una respuesta policlonal por IgE e IgG asociada a los linfocitos B (estímulo mitogénico), y contribuye a la estimulación de una mastocitosis, que se asocia a una respuesta inflamatoria al producirse la degranulación de esas células, además induce a los macrófagos a producir la IL-1, que estimula a los linfocitos B pero colateralmente deprime a las células Th1, el significado biológico de esta activación, es producir grandes cantidades de anticuerpos no específicos, que pueden cubrir los determinantes antigénicos en los parásitos y prevenir la operación de los mecanismos efectores, tales como los de anticuerpos específicos y la inmunidad mediada por células, además se ha visto una interrelación entre IL-4 y el interferón gama (INF γ), en la que funciona como un potente desactivador del INF γ en el contexto de la producción de IgE en helmintiasis humanas

(Qi Huang et al.; 1995, Finkelman et al; 1995, Thakur et al, 1998)

Las células Th2, producen también IL-6 que se asocia con la respuesta de fase aguda y contribuye al incremento policlonal en gammaglobulinas por inducción de diferenciación de células B a células plasmáticas (Thakur et al., 1998)

Los TES, también inducen la producción de IL-5 la cual, es una poderosa inductora de eosinofilia tanto a nivel local como a nivel sanguíneo. Se ha observado en ratones con infección previa que muchas larvas de *Toxocara canis* son retenidas en el hígado incluidas en granulomas eosinofílicos, si a esos animales se les trata con un anticuerpo monoclonal específico contra la IL-5, se provoca una importante reducción de este tipo de células, pero no se reduce la dimensión de las zonas inflamadas y los eosinófilos son sustituidos por linfocitos, macrófagos y células gigantes lo cual, implica la existencia de otros sistemas relacionados con este proceso en la infección que se encarga de retroalimentarlo. La eosinofilia, se induce con apenas una pequeña cantidad de larvas (5 huevos larvados) y son los TES los responsables de esto, ellos mismos son responsables de producir adherencia a la superficie de las larvas de los eosinófilos. La IL-5 además de estimular la producción de eosinófilos, parece ser un factor quimiotáctico de esas células de proliferación, promueve su diferenciación, degranulación, producción elevada de superóxidos y citotoxicidad dependiente de anticuerpos y, además prolonga su supervivencia requiriéndose muy pequeñas cantidades de esta citosina para inducir la eosinofilia (Thakur et al., 1998)

Los linfocitos dobles negativos (CD4- CD8-), también pueden producir IL-5 y están distribuidos en piel, timo, intestino delgado, hígado, médula ósea y pulmón, son los responsables de amplificar el estímulo eosinopoyético, además, se ha encontrado que los eosinófilos cuentan con un IL-5rna, lo cual les permite producir esta citosina y desarrollar un sistema de autorregulación una vez que han sido estimulados (Kusama et al., 1995; Kuroda et al., 2001).

La eosinofilia, ocurre primariamente en el hígado presentándose una gran concentración de estas células en las zonas de migración de las larvas, ha sido difícil establecer el papel funcional de este proceso en la infección, ya que no existe ninguna evidencia directa de que las larvas mueran como consecuencia de su interacción con los eosinófilos, ya que se han hecho incubaciones de larvas en suero inmune y eosinófilos, observando adherencia de estas células y degranulación de las mismas, pero las larvas no presentan ninguna alteración. Esto además resulta importante en las lesiones a nivel microscópico ya que el eosinófilo una vez degranulado es difícil diferenciarlo de un neutrófilo (Parsons et al., 1993).

Se ha observado, que en ratones re infectados con larvas de *Toxocara canis* éstas, son atrapadas en hígado y retenidas, pudiendo retenerse aquí al menos tres meses en granulomas fuertemente infiltrados con eosinófilos, pero los parásitos, finalmente salen de ellos y continúan su migración (Parsons et al., 1993).

A nivel pulmonar, se ha observado que los eosinófilos de los ratones infectados con larvas de *T. canis*, no presentan los receptores de IgE, lo cual sugiere, que esas células no pueden matar a las larvas por un mecanismo

dependiente de IgE, los eosinófilos de humanos si presentan esos receptores, pero tampoco son eficientes. Los eosinófilos no pueden atravesar el endotelio vascular armados con antígenos monoméricos específicos, por lo que para que ocurra la interacción, el eosinófilo, deberá contactar con una superficie cubierta de anticuerpos del isotipo adecuado que se encuentra en la superficie de los gusanos, para desarrollar una citotoxicidad celular o degranulación específica de antígeno, fenómeno que no se observa aún incluso en otros tejidos, o no resulta eficiente por el esquema de comportamiento de los TES (Parsons et al., 1993; Jones et al., 1994).

Los eosinófilos, son células con diferenciación terminal, son la mayor fuente de las 4 distintas proteínas catiónicas: la neurotoxina derivada del eosinófilo, la proteína catiónica eosinofílica, la peroxidasa eosinofílica y la proteína básica mayor, estas, juegan un papel importante en la defensa del hospedero contra helmintos, en condiciones normales, tienen un receptor de baja afinidad para IgE y ya activados, expresan uno de alta afinidad para IgE asociado a la defensa contra parásitos.

Por medio de sus receptores de IgE, los eosinófilos se unen a parásitos opsonizados por IgE, produciendo la activación y liberando los mediadores tóxicos, como la peroxidasa eosinofílica y la proteína mayor del eosinófilo, también se ha encontrado, que producen incremento de oxígeno tóxico y leucotrienos, son capaces de producir citocinas como factor de crecimiento tumoral beta (TGF β) (que promueve la producción de colágena y el desarrollo de fibrosis), inducir la producción de IL-5, IL-3 y GM-CSF que favorece la supervivencia de estas células, C-C quimiosina

RANTES y eotaxina que son quimioatrayentes y potentes activadores de los eosinófilos(Thakur et al., 1998)

Como complemento de la actividad de las citocinas, la IgE tiene actividad protectora contra las infecciones parasitarias, la hipersensibilidad inmediata, puede estar involucrada como un mecanismo específico de defensa contra los helmintos, en esquistosomiasis, los altos niveles de IgE crean resistencia a las reinfecciones. En la toxocariosis humana, las larvas producen TES que se depositan durante la migración por tejidos blandos, mientras la respuesta de anticuerpos contra la larva migrante puede ser protectora, los TES son responsables de inducir daño tisular y manifestaciones patológicas. La naturaleza del estímulo que induce la producción inespecífica de IgE, esta poco entendido en las helmintiasis sistémicas. La respuesta, puede depender de la naturaleza de los antígenos, la dosis, ruta de depósito, la genética del hospedero, el nivel de maduración del sistema inmune, la respuesta de citocinas y quimiocinas, así como por las células presentadoras de antígenos y la activación de señales tales como B7 o B7.1 y CD28(Thakur et al., 1998).

Esta infección, inicialmente induce un incremento policlonal inespecífico en la IgE (10 a 15 veces la normal), las IgE específicas para los helmintos, aparecen al final del incremento definitivo de estas.

Los pacientes con enfermedades alérgicas, tienen un nivel de IgE que es 10 veces mayor que el de individuos no atópicos, aquellos con helmintiasis invasivas pueden tener hasta 100 veces ese valor, en contraste con los individuos atópicos y sólo el 10% de la IgE total es específica de los parásitos.

La respuesta de IgE en enfermedades alérgicas, esta restringida a unos pocos alérgenos, la respuesta de IgE en helmintiasis, es hacia un amplio rango de antígenos parasitarios por lo que se puede diferenciar con claridad una condición alérgica, de la respuesta inmune contra algunos helmintos (Takamoto et al., 1995).

Todo este mecanismo activado, que significa un importante desgaste para el hospedero resulta inútil desde la óptica de protección pues el organismo presenta la capacidad de estar renovando permanentemente los TES, los cuales se desprenden de este y la respuesta no afecta a los estados larvarios pero los productos liberados si tienen efectos en detrimento de los tejidos del hospedero que se asocian con la persistencia de los procesos inflamatorios por períodos prolongados.

Estudios con infecciones inducidas con larvas de *Toxocara canis*.

Se han establecido varios esquemas de trabajo para profundizar en el conocimiento de esta parasitosis empleando diferentes distintas especies animales.

Uno de esos modelos empleados fue en macacos a los que se les inoculó con 100,000 a 400,000 huevos del parásito, evaluando los efectos a nivel hemático, clínico y patológico. Observando que los animales desarrollaron anemia gradual asociada con leucocitosis, en la que predomina la eosinofilia elevada, los animales presentaron: anorexia, depresión, debilidad, incoordinación, alteraciones locomotoras y emaciación, detectando la presencia de larvas principalmente en hígado, corazón, pulmones, riñón y en especial en cerebro y musculatura

esquelética y la presencia de los estadios larvarios se asoció con hemorragias y procesos inflamatorios severos (Tomimura et al., 1976).

También están descritas inoculaciones en humanos con las fases infectantes del nematodo reportándose dentro de los primeros días fiebre, eosinofilia que llegó al 52%, leucocitosis con hasta 24,000 células por mililitro, manteniéndose durante los quince meses de observación la eosinofilia, observándose que tanto en individuos inoculados como en aquellos en los que se detecta la infección adquirida de forma natural, la persistencia de altos títulos de anticuerpos ocurre por un plazo de hasta cinco años y la sensibilización que producen las larvas se ha relacionado por mucho tiempo con el desarrollo de asma en la población infantil. (Smith et al.; 1953, Beaver et al., 1951; Tomimura et al.; 1976, Takur et al., 1998; Pinelli, 2001; Fenoy et al., 1992).

Se ha observado que los trastornos asociados a esta modalidad del parasitismo se agravan cuando ocurren reinfecciones y el hígado víscera en la que se produce un encapsulamiento temporal es particularmente dañado, por lo que el desplazamiento se retrasa debido a la inflamación, con grave deterioro de las funciones durante un período prolongado, sin que esto signifique la destrucción de las larvas (Parsons, 1990; Parson et al., 1993; Fenoy et al., 2001).

En el modelo desarrollado en roedores infectados con larvas de *Toxocara canis* se ha encontrado que sufren diversos grados de alteración, que guardan una relación con la cantidad de parásitos alojados en su cuerpo, así como la distribución que presenten, afectando su comportamiento (agresividad, aprendizaje, aislamiento, etc), y que

incluso, hay variaciones asociadas a la cepa de ratón y el comportamiento clínico que se desarrolle asociado a la infección, esto en condiciones naturales es un factor favorable o desfavorable para incrementar la probabilidad para la depredación y favorecer o desfavorecer la dispersión del parásito en la naturaleza (Worley et al, 1984; Holland, 2001).

Se considera que los trastornos producidos por los estadios larvarios se originan primariamente de la interacción larva-tejido resultando un proceso físico inicialmente asociado a destrucción tisular y producción de hemorragias pero además se considera un factor complementario que son los productos de excreción y secreción de las larvas, estos tienen propiedades antigénicas y en apariencia tienen un papel relevante en la interacción con los tejidos del hospedero generando una actividad química (enzimática), además de desencadenar violentas respuestas por el sistema inmune constituyendo un componente de importancia en el desarrollo de la enfermedad.

Antígenos de *Toxocara canis*.

La capacidad de estos parásitos para sobrevivir en los tejidos del hospedero, pese a las reacciones generadas por el mismo, es un factor importante en el proceso de adaptación de estos a sus hospederos. En este sentido, las larvas son capaces de producir una serie de macromoléculas de naturaleza glucoproteica, que son reconocidas antigénicamente y que son conocidas como antígenos de secreciones y excreciones (TES), estos antígenos

aparentemente varían de acuerdo a las diversas condiciones fisiológicas del nematodo y forman parte de la envoltura externa del mismo (Page et al., 1992).

La cutícula está cubierta por un glicocalix rico en carbohidratos que forma una envoltura aniónica vellosa de aproximadamente 10 nm de espesor y esta delimitada a una distancia similar por la epicutícula y ambas pueden observarse en las figuras 2 y 3. La superficie de la cutícula parece tener un papel importante como mecanismo de evasión, ya que se desprende cuando interactúa con granulocitos o anticuerpos. La composición de la cutícula es semejante en los nematodos parásitos y en los de vida libre, pero la existencia de componentes como los TES son una adaptación al parasitismo. Estos productos eliminados

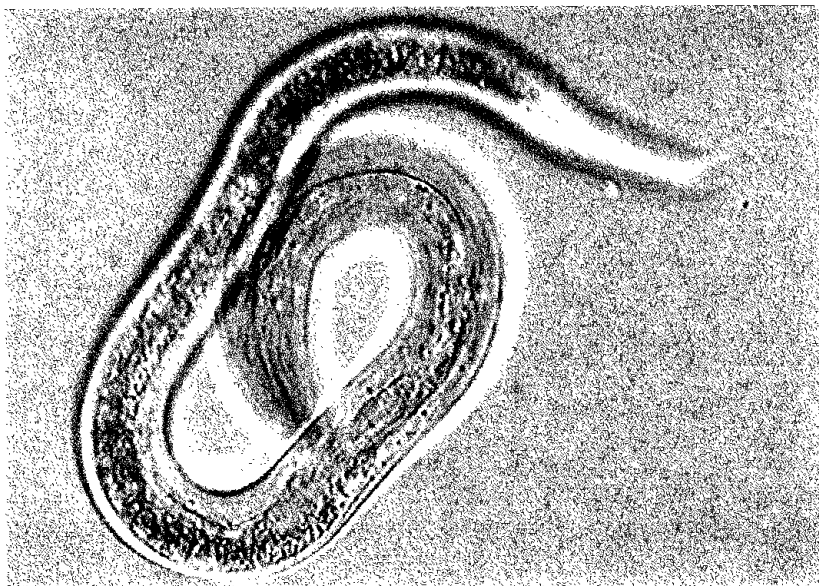


Figura 2.-Segundo estado larvario de *Toxocara canis*, se puede observar los intestinos (I), las glándulas esofágicas y el poro excretor del organismo 20X.

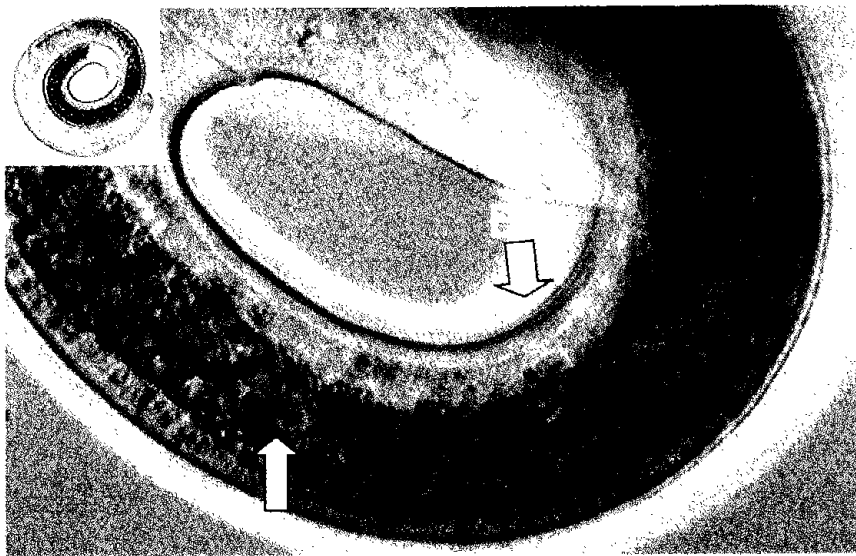


Figura 3.- se muestra una porción del cuerpo de una L2 de *Foxocara canis* en la que se puede observar la cutícula y epicutícula. En el margen superior izquierdo integro el organismo.

llegan a representar el 1% del peso de las larvas por día y se producen durante períodos prolongados, por lo que existe una importante dependencia metabólica hacia los hospederos y causan un desgaste constante en estos (Page et al., 1992). El sitio de producción de los TES son las glándulas esofágicas que se abren en la luz del esófago y vierten su contenido por la boca, emitiendo además ramificaciones caudales que se abren en el poro excretor y que producen una auténtica barrera protectora sobre el cuerpo del nematodo que los aísla del hospedero. Los TES se desprenden y recambian, cada larva produce hasta 200 μ g de proteína por día. (Smith et al.; 1983, Maizels et al.; 1984,

Maizels et al.; Munira, 1986; Sher, 1995; Gems y Maizels, 1996; Mustoe, 1999).

Los TES han sido estudiados bajo varios sistemas para determinar sus propiedades químicas y biológicas, entre ellos está el análisis bioquímico, inmunológico y se ha llegado al genético, realizándose estudios considerados como pioneros con este género, al estudiarse los genes se han podido sintetizar los antígenos de *Toxocara canis* por medio de tecnología recombinante. Además, se ha identificado la producción de una gran variedad de sustancias las cuales cumplen diversas funciones en la interacción parásito-hospedero y químicamente corresponden a: mucinas, lectinas, proteasas, inhibidores enzimáticos y otros. (Glickman et al, 1979, Munira, 1986, Magnaval et al., 1991 Magnaval et al., 1992, Fenoy et al., 1992, Gems y Maizels, 1996, Asao et al., 1997, Yamasaki et al., 1998, Maizels, 2000, Cuéllar et al., 2001, Kramer et al., 2002).

Los TES fueron aislados primariamente por De Savygni en 1975 quien desarrolló el proceso para el aislamiento y cultivo de larvas de *T. canis* en medio mínimo esencial. Los TES los aisló del sobrenadante y los empleó para el diagnóstico inmunológico y puede observarse el patrón observado en la figura 4. Badley et al., en 1987a, detectaron 15 bandas proteicas en los TES.

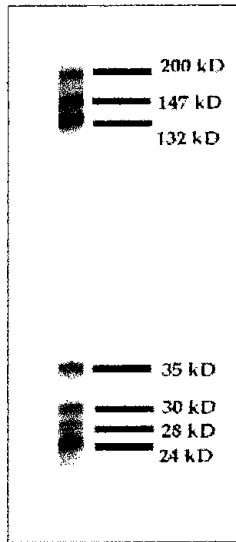


Figura Número 4.- Patrón de antígenos identificado originalmente en humanos por De Savigny, 1975.

Gradualmente se han desarrollado y aplicado técnicas cada vez más sofisticadas para estudiarlos permitiendo su caracterización y secuenciación, en la actualidad usando geles bidimensionales, se han descrito hasta 50 macromoléculas diferentes en los sobrenadantes de los cultivos. Existen discrepancias en el número y tipo de moléculas que se encuentran en los TES, probablemente las moléculas detectadas, están mas relacionadas con las técnicas empleadas para su obtención que por diferencias biológicas como ejemplo de estas divergencias se puede observar en la figura 5 el patrón de reconocimiento de los TES observado en niños asmáticos (De Savigny, 1975; Glickman, 1979; Maizels et al., 1984; Medhji y Maizels, 1986; Aguila de la Puente et al., 1988; Wade y Georgi, 1987; Magnaval et al.; 1991, Bardou et al.; 1995, Gems y Maizels; 1996 Jacobs et al.; 1997, Yamazaki et al., 1998; Epe et al, 1999).

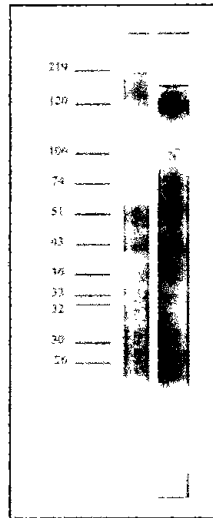


Figura número 5.- Bandas de antígenos secretores y excretorios de *Toxocara canis* detectados por medio de la técnica de Western Blot en sueros de niños asmáticos y sanos positivos en prueba de ELISA-IgG (Muñoz , 2003) .

Se ha determinado que los TES tienen una serie de propiedades biológicas relacionadas con la capacidad inmunoevasora que presentan las larvas. Lo anterior se desprende de los siguientes hechos: Los TES son depositados temporalmente en la superficie cuticular (constituyen la epicutícula) del gusano pero su unión con la misma es muy fácil de romper, reaccionan con los anticuerpos y granulocitos del hospedero, pero al ocurrir la interacción con estos últimos se desprenden, constituyéndose este recambio en un excelente mecanismo de evasión de la respuesta inmune del parásito (Page et al., 1992). También se ha encontrado que estos productos son capaces de neutralizar algunos de los componentes del complemento y a los anticuerpos IgG que podrían ser importantes en la destrucción de las larvas (Jane et al., 1987).

La aparición de los antígenos ocurre gradualmente en cantidad y en diversidad, el antígeno más frecuentemente detectado es el de 120 kDa, existiendo variaciones en

cuanto a la capacidad de reconocimiento por la respuesta inmune en las diferentes especies, por ejemplo los sueros de conejo no reconocen los mismos antígenos que los sueros de humano (Page et al., 1992).

Los TES activan inespecíficamente a los linfocitos B, induciendo producción policlonal de inmunoglobulina G (IgG) e inmunoglobulina E (IgE). También inducen la activación de macrófagos para producir interleucina 1 (IL-1) que a su vez estimula a linfocitos B y a los eosinófilos. Se ha planteado que los TES funcionan como potentes mitógenos de los linfocitos B y que esta activación no específica produce grandes cantidades de anticuerpos inespecíficos y por lo tanto distraen la respuesta inmune (Mehhji y Maizels, 1986; Parson et al., 1993; Wang et al., 1995; Finkelman, 1995)

Se ha encontrado también que los eosinófilos de pulmón, células que tienen un potencial helmintotóxico, en el ratón carecen de los receptores de IgE lo cual los incapacita para matar a los estadios larvarios, a diferencia de lo que ocurre con los eosinófilos de humano y de rata que si los presentan (Jones et al., 1994; Hiratochi et al., 2000). Los antígenos son capaces de afectar la adherencia de los eosinófilos a la superficie del gusano, en función a que se desprenden una vez que ocurre la interacción célula-cutícula del organismo (Badley et al., 1987b, Page et al., 1992).

Las bandas de 120 kDa y 400 kDa de los TES tienen la capacidad de reaccionar heteroespecíficamente con los antígenos A y B de grupos sanguíneos en virtud de que esas porciones presentan los mismos azúcares (N-acetilgalactosamina y galactosa) en las unidades terminales, estos también presentan un recambio constante y

también han sido demostrados en nematodos como: *Ascaris lumbricoides*, *Trichinella spiralis*, *Necator americanus* y platelmintos como: *Fasciola hepatica* y *Taenia saginata* (Meghji y Maizels, 1986).

Otros helmintos producen antígenos de secreción y excreción de la misma naturaleza y con el potencial de cruzar antihigiénicamente con los generados por *Toxocara canis* particularmente con aquellos de alto peso molecular, entre ellos se puede citar a: *Strongyloides* sp, *Ascaris suum*, *Toxascaris leonina*, *Anisakis simplex*, *Capillaria* sp. *Schistosoma* sp. Y *Onchocerca* sp., *Trichuris muris*, *Trichinella spiralis* e *Hysterothylacium aduncum*, entre otros que también pueden causar el síndrome de larva migrans visceral (Magnaval et al.; 1991, Cuéllar et al., 1993; Cuéllar et al., 1995; Iglesias et al., 1996; Stevenson y Jacobs, 1977; Nicholas et al.; 1984, Fenoy et al., 1989; Lynch et al., 1993).

Hay datos tanto con *Toxocara canis* como con *Trichinella spiralis* acerca de que la exposición continua del hospedero a grandes y constantes cantidades de antígenos secretores y excretores inducen un fenómeno de autoinmunidad a nivel muscular que origina una miosistis crónica, proceso asociado al desarrollo de autoanticuerpos contra las fibras musculares. (Macura et al., 1998).

El TES-26 es uno de los antígenos más abundantemente expresados en las larvas de *Toxocara canis*. Químicamente se ha caracterizado como una fosfatidiletanolamina. Una proteína de adherencia que presenta un alto porcentaje de identidad con la proteína homóloga de mamíferos (fosfatidiletanolamina de esperma), se han encontrado compuestos semejantes a este en filarias como *Onchocerca volvulus* y *Brugia malayi*. Dentro del conjunto de los TES se

presenta en bajas proporción en la superficie de los nematodos (Loukas et al., 1999),.

El TES 32 esta ubicado en eje externo de la epicutícula de las larvas, se ha sugerido que puede servir como un elemento que permite extender las mucinas en la superficie del nematodo, participando de esta manera en el proceso de morfogénesis de la cubierta de los parásitos. Químicamente su composición guarda semejanza con la de las lectinas tipo C (dependientes de Calcio). Tiene afinidad para adherirse a carbohidratos principalmente manosa y galactosa. Compuestos pertenecientes a esta familia de lectinas en los mamíferos, son receptores en las células del sistema inmune como la selectina, el receptor de baja afinidad de IgE, CD23, DEC 205, los receptores de las células NK Ly 49 y CD 94, las lectinas de las células presentadoras de antígenos tales como el receptor de manosa de los macrófagos (Loukas et al., 1999), el receptor DEC 205 de las células dendríticas el receptor de baja afinidad de IgE. Además de la proteína A adherente a manosa en productos contenidos en el suero de mamíferos y algunas moléculas defensivas en invertebrados. Este es pues el primer ejemplo de una proteína relacionada con el sistema de defensa del hospedero, siendo usada por un parásito para contrarrestar los mecanismos de inmunidad del mismo como elemento distractor, ya que se mimetiza con las proteínas que forman parte del sistema inmune de los hospederos o compite con las selectinas de superficie de las células del hospedero, pero como son un factores solubles que puede resultar más efectivo por esa propiedad, lo cual puede dar como resultado el bloqueo de la adhesión de los leucocitos a las paredes vasculares, para prevenir las primeras etapas del proceso de infiltración tisular, característico de la

respuesta inflamatoria, fenómeno en estudio actualmente. También se han encontrado proteínas equivalentes en *T. cati* y *Parascaris equorum*. Existen otros tipos de lectinas tipo C en *Toxocara canis* que presentan algunas semejanzas con TES-32 con ligeras diferencias en la composición de aminoácidos pero con una misma especificidad para los sitios de unión a los de TES-32, ellos han sido denominado CTL-2 y CTL-3, existe una cuarta lectina que corresponde a TES 70 que se describe más adelante y hay algunas evidencias de que TES-45 y TES-55 tienen propiedades de lectinas (Gems y Maizels, 1996; Maizels et al., 2000).

Los TES-45 y TES-55 son glucoproteínas con propiedades de lectinas con afinidad a manosa y agarosa, se ha demostrado que estos antígenos presentan gran parecido estructural con TES-32, el cual aparentemente también tiene propiedades no demostradas hasta el momento de lectina (Loukas et al., 1999),

Los TES-70 (Tc-CTL4, Lectina 4 Tipo C), son una glucoproteína relativamente abundante, que se ha demostrado como lectina tipo C, exhibiendo una capacidad para adherirse a la superficie de células epiteliales en un mecanismo dependiente de calcio, lo cual muestra que este componente del parásito, actúa como ligando a receptores de membranas celulares del hospedero, esta reacción de lectina ocurre también con inmunoglobulinas provocando su precipitación (Gems y Maizels, 1996; Maizels, Tete y Loukas, 2000).

Los TES-120 (Mucinas: Tc MUC-1, Tc MUC-2, Tc MUC-3, Tc MUC-4, Tc MUC-5) son el mayor componente de la cubierta de las larvas de *Toxocara canis* y se ha propuesto que forma

una lámina de recubrimiento sobre la cutícula del nematodo, en apariencia está constituido por 4 componentes que forman bandas que corren en los 120 kDa y corresponden químicamente con mucinas de las cuales aparentemente hay cinco variantes distintas en el parásito, todas directamente relacionados con TES-120. La mucina es una proteína presente en forma normal en los epitelios de los organismos superiores, es secretada por células especializadas cumpliendo con una función de recubrimiento que aísla las superficies celulares desempeñando una función protectora, la presencia de estos compuestos en la superficie del cuerpo de estos organismos puede asociarse a una condición mimética en primer término, que se complementa con su renovación constante derivada de su desprendimiento cuando se produce interacción del parásito con los componentes de la respuesta inmune del hospedero constituyéndose en un mecanismo de evasión de la respuesta inmune (Gems y Maizels; 1996, Maizels, Tetch y Loukas, 2000).

Las mucinas asociadas a membranas tienen una relación muy cercana con las capacidades de adhesión de las células, ya sea por el efecto de las cargas electrostáticas (presenta una fuerte carga negativa) y los efectos estéricos derivados de moléculas con grandes cadenas, que se proyectan en la superficie del cuerpo de los vermes. (Gems y Maizels, 1996). Este factor se refleja en la inhibición de la adhesión de las células T y la citotoxicidad de CD43 y la expresión de las MUC-1, además de la habilidad de los eosinófilos para adherirse y matar esquistosomas *in vitro*. Los inmunólogos han sugerido que las mucinas tales como la MUC-1 pueden proteger la superficie luminal de las células endoteliales del daño potencial derivado de los procesos

oxidativos relacionados con los macrófagos y de este modo los efectos de la respuesta inmune del hospedero se desvían haciéndolos ineficientes (Gems y Maizels, 1996; Maizels, Tete y Loukas, 2000).

Los TES-400 químicamente son proteínas con características de proteoglicano de mamífero tales como el agrecano y brevicano que contienen dominios de lectina en el contexto de una estructura altamente glicosilada, que no se encuentra como componente de la superficie de los nematodos por lo que aparentemente se libera al exterior desde el interior del cuerpo de los nematodos (Gems y Maizels, 1996; Maizels, Tete y Loukas, 2000).

La olfactonedina es una glucoproteína encontrada en la matriz mucosa que forma la epicutícula de *Toxocara canis*, que forma parte del recubrimiento en el neuroepitelio respiratorio de las ranas, se desconoce su papel en la estructura del recubrimiento de estos parásitos (Gems y Maizels, 1996, Maizels, Tete y Loukas, 2000).

Se aisló un gene para aquaporina y otro para prohibitiva, la primera es una proteína formadora de canales membranales, esta puede estar relacionada con la elevada presión hidrostática que presentan los cuerpos de los nematodos que son únicos entre los animales por presentar un esqueleto hidrostático requerido para la locomoción y para varios procesos fisiológicos, lo cual hace necesario que sus cuerpos se vean sometidos a grandes fluctuaciones de su presión osmótica en especial en las fases juveniles de nematodos que son transferidos del suelo al interior de hospederos ya que permite el transporte

selectivo de agua al interior de sus cuerpos a través de las membranas y que les permite desarrollar todas sus funciones, lo cual puede ser especialmente importante durante la fase de arresto que se desarrolla en los tejidos de los hospederos paraténicos y les permite sobrevivir por largo tiempo en ellos. La segunda proteína es un compuesto inhibidor del ciclo celular que puede estar relacionado en *Toxocara* con el proceso del arresto larvario, la sustancia encontrada en este nematodo guarda similitud con la demostrada en las moscas *Drosophyla melanogaster* en la cual esta ligada a la regulación del desarrollo de los estadios larvarios y a los procesos de muda (Gems y Maizels, 1996; Maizels, Tetch y Loukas, 2000).

Se han reconocido enzimas proteolíticas del tipo de la cistein-proteasas y serin-proteasas (enzimas del grupo de la papaina) entre las primeras están las catepsinas como la catepsina L que es una cistein-proteasa junto con la catepsina Z, con pesos de 30 y 52 kDa aproximadamente, forman parte de mecanismos de virulencia y enzimas digestivas de parásitos y otros agentes infecciosos. En los helmintos se han descrito una gran cantidad de tipos de catepsinas de ellas la más frecuente ha sido la catepsina B, la cual se relaciona con la invasión a tejidos, con procesos de alimentación y el fenómeno de la muda habiéndose encontrado en: *Haemonchus contortus*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Strongyloides ratti* y *Ancylostoma caninum*. Las catepsinas del grupo B son importantes y se asocian a la catepsina L, que es menos común y ha sido encontrada en trematodos y cestodos en los que juega un papel importante en procesos de inmunoevasión

y ha sido descrita en *Brugia malayi* y recientemente en *Toxocara canis* (Loukas et al., 1998).

La Asparaginil-endopeptidasa es también conocida como legumina, es del grupo de las cistein-proteasas las cuales presentan semejanza con la actividad de la papaina, funcionan en los helmintos como hemoglobinasas, están demostradas en las larvas de *Toxocara canis* y son productos secretados al medio externo.

Las superóxido dismutasas se han encontrado como dímeros de 20 a 22 kDA en extractos de larvas, como se sabe este sistema enzimático juega un papel importante como mecanismo de evasión de la respuesta inmune que ya ha sido demostrado en otros nematodos, están demostrados al menos cuatro genes codificadores para su producción, los procesos de síntesis determinados para estos productos indican que se trata de productos que son liberados por el organismo al medio externo (Gems y Maizels, 1996; Maizels, Tete y Loukas, 2000).

HIPOTESIS.

Se plantea que las alteraciones asociadas a la presencia y desplazamiento de las larvas 2 de *Toxocara canis* además de ser inducidas por una interacción física con los estadios larvarios del nematodo están asociadas con la liberación y difusión de productos metabólicos de secreción y excreción con propiedades antigénicas.

JUSTIFICACION.

Se han identificado decenas de antígenos secretores y excretores producidos por las L2 del nematodo *Toxocara canis*, se producen permanentemente y se desprenden al entrar en contacto con anticuerpos del hospedero o con las células del sistema inmune como los macrófagos y eosinófilos, posterior a su desprendimiento ocurre su resíntesis y renovación constante, lo cual, representa un porcentaje importante de los procesos metabólicos que ocurren en el parásito y, esa propiedad le significa un excelente mecanismo de inmunoevasión. Por otra parte se han realizado un gran número de estudios analizando la dinámica de migración, así como las alteraciones que producen los organismos durante su desplazamiento tanto en individuos con infección natural, como en animales de diferentes especies con infecciones experimentales y se ha encontrado un patrón definido en cuanto la ruta y evolución de las lesiones que producen, en las que se involucra la interacción física del organismo y los productos que son liberados, esos cambios consisten primariamente en la destrucción de los tejidos, causando hemorragias que se asocian con la aparición de procesos inflamatorios que, finalmente integran granulomas, los cuales envuelven a las larvas, que pueden permanecer viables por períodos prolongados, afectando a sus hospederos durante el resto de la vida, a un punto de que la afección causada por los estadios larvarios resulta de mayor importancia que la causada por las formas adultas.

La aportación que se pretende con este trabajo es unir los dos aspectos citados anteriormente para demostrar el papel que desempeñan los productos de secreción-excreción

liberados por las larvas del nematodo en el desarrollo y persistencia de las lesiones.

Objetivos.

Objetivo general:

Detectar la presencia de antígenos de excreción y secreción de larvas del nematodo *Toxocara canis*, en los tejidos de jerbos (*Meriones unguiculatus*), durante los procesos de migración y asentamiento.

Objetivos particulares:

1.-Estandarizar una técnica inmunohistoquímica para la detección de antígenos de los estados larvarios de *Toxocara canis*.

2.-Determinar la relación entre la concentración de los antígenos de *Toxocara canis* en las lesiones asociadas a la presencia de los estados larvarios en jerbos con infección inducida durante un período de sesenta días.

3- Contribuir al estudio de los mecanismos patógenicos desarrollados durante la infección producida por las larvas de *Toxocara canis* en los jerbos.

Material y Métodos.

Animales

Se utilizaron 70 jerbos mongólicos (*Meriones unguiculatus*) machos aproximadamente de tres meses de edad procedentes de la colonia existente en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, los cuales fueron alojados en cajas de policarbonato diseñadas para mantenimiento de ratas, suministrándoseles agua y alimento para roedores (Ralston Purina, USA) *ad libitum*.

Para obtener suero contra los antígenos de secreciones y excreciones se utilizaron 5 conejos machos de raza Nueva Zelanda de aproximadamente 1 mes de edad y 1 kg de peso corporal. Se alimentaron con un producto comercial y agua *ad libitum*, se colocaron en jaulas especiales para esta especie y se les dio mantenimiento de limpieza y alimentación diariamente.

Obtención del inóculo

La obtención y cultivo de huevos se realizó modificando el método descrito por Ohima en 1961. Se recolectaron parásitos adultos de *T. canis* a partir del intestino delgado de cachorros de entre uno y tres meses de edad con infestación natural. Las hembras de *T. canis* fueron separadas de los machos y colocadas en cajas de Petri con solución amortiguadora de fosfato (PBS), se extrajo el

útero por una incisión en la parte media del cuerpo. Los úteros obtenidos se colocaron en solución salina fisiológica y se obtuvieron los huevos, después con un colador fino se eliminaron los restos y membranas del parásito. Los huevos se sometieron a varios lavados con PBS mediante centrifugación a una velocidad de 600 x g durante 5 minutos para eliminar el exceso de contaminantes. El botón de huevos sedimentados fue resuspendido en formol al 2% en PBS. Los huevos obtenidos fueron colocados en cajas de Petri estériles conteniendo una solución de formol al 2 % y se incubaron en una estufa bacteriológica, a temperatura entre 20 y 22 °C durante 28 días para lograr el desarrollo de la larva 2 pasiva infectante. Al término del proceso se verificó la viabilidad de los cultivos mediante la observación al microscopio del movimiento larvario dentro de los huevos.

La estimación de huevos en el inóculo se realizó contando al microscopio 10 veces el total huevos larvados presentes en 20 µl de cada cultivo depositados en un portaobjetos, se sacó el promedio y se multiplicó por 50, el resultado fue el número de huevos larvados por ml de medio.

En el momento de la inoculación, la suspensión se lavó para dejarla libre de PBS formolado y se resuspendió en solución salina fisiológica (SSF). El inóculo se concentró a 4000 huevos por ml, para alcanzar una concentración de 1000 huevos larvados de *Toxocara canis* (hltc) en 0.25 ml de la suspensión.

Protocolo experimental

Inoculación de los conejos

Todos los conejos fueron inoculados intragástricamente con una sonda tipo Foley con 5,000 huevos larvados el día cero y 105 post-infección. Se extrajo una muestra de sangre por punción venosa a los cero, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85 y 127 post-infección. La sangre contenida en tubos se colocó en baño María a 37 C por 30 minutos. Posteriormente se removió el coágulo con un aplicador de madera, se centrifugó a 2500 rpm durante 2 minutos, el suero se colocó en tubos Ependorf los cuales se rotularon con el número de lote, identificación del conejo y fecha. Se almacenó congelado a -20 C.

Inoculación de los jerbos.

Los 70 jerbos fueron divididos en dos grupos. El primero con 65 animales que fueron inoculados intragástricamente con una sonda tipo Foley para neonatos con 1000 huevos larvados en 200 μ l. El segundo grupo con 5 animales solo recibió solución salina fisiológica y se uso como grupo testigo.

Se sacrificaron por desnucamiento cinco animales del grupo inoculado a los 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60 días pos-inoculación (d.p.i.), los 5 animales no inoculados fueron sacrificados a los cinco días de inoculación del grupo experimental. Una vez sacrificados a

los animales se les extrajeron por separado diferentes órganos incluyendo : intestino, hígado, pulmón, riñón, cerebro, ojo y músculo esquelético, se describieron las lesiones macroscópicas en cada uno de ellos y se fotografiaron para ser documentados. Todos los órganos se fijaron en formol al 10% amortiguado con PBS para fijarlos por un mínimo de 24 horas y someterlos a su procesamiento histopatológico.

Procesamiento histopatológico de tejidos de jerbos inoculados con larvas de *Toxocara canis*.

Después de la fijación, los tejidos fueron pasados por alcoholes de diferente graduación partiendo de 60% hasta absoluto con la finalidad de deshidratarlos, posteriormente se pasaron en varias etapas a xilol con la finalidad de aclarar los tejidos y, finalmente se incluyeron en parafina, para formar cubos y poder cortar los tejidos en un microtomo a un espesor de 4 a 6 μm . Se realizaron cuando menos cinco cortes de cada una de las muestras de acuerdo con el proceso descrito por Garrido en el 2000. Uno de los cortes se empleó para hacer la tinción de hematoxilina-eosina (HE) y poder analizar las alteraciones que presentaban las muestras, tres se usaron para desarrollar la prueba inmunohistoquímica incubando con el anticuerpo primario y demostrar la presencia de los antígenos que se buscaban y la muestra restante se utilizó como testigo no expuesto al anticuerpo primario.

Para poder realizar las pruebas inmunohistoquímicas a los tejidos de los jerbos se requirió de suero de conejo infectado con larvas de *Toxocara canis*, para lo cual se procedió de la siguiente manera:

Obtención y mantenimiento de larvas infectantes (L2).

La obtención de las larvas se efectuó siguiendo el método de De Savigni modificado por Bowman en 1987. Se partió de una suspensión de huevos larvados en solución salina fisiológica, la cual se colocó en un tubo de plástico de 60 ml, se realizaron 4 lavados de la siguiente manera: se centrifugó a 4500 rpm durante 5 minutos, se decanto el sobrenadante y la pastilla se reconstituyó en solución salina fisiológica estéril; finalmente se reconstituyó la pastilla con solución de cloro al 1%, en donde se dejó reposar durante 10 minutos, después se centrifugó a 4500 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante; en campana de flujo laminar, la pastilla se resuspendió con medio de cultivo RPMI-1640, glucosa 1% estéril y se cambió el tubo de plástico de 60 ml, se centrifugó a 4500rpm durante 5 minutos, realizando este paso 4 veces y en condiciones estériles (DeSavigny, 1975; Bowman et al. 1987)

Se resuspendió la pastilla con medio RPMI-1640 con agitación por medio de una plancha magnética por 15 a 20 minutos, para inducir la eclosión de la larva infestante L2, al tener una eclosión igual o superior al 80% se detuvo la agitación y se transfirieron las larvas a un microaparato de Baermann estéril, compuesto de un tubo de

plástico y un cono hecho con cuatro capas de papel limpia lentes, colocado de tal forma, que tuviera contacto con el medio RPMI-1640, se incubó a 37 C durante 24 horas en una estufa de CO₂, quedando las larvas viables en el fondo del tubo de plástico, se realizó un conteo de larvas viables, se recolectaron y se distribuyeron en cajas Falcon (± 10,000 larvas viables en 10 ml de medio RPMI-1640, glucosa 1%), se rotularon las cajas Falcon con fecha y se colocaron en incubación a 37 C con 5% de CO₂ y 95% de humedad.

Obtención de Antígenos secretores-excretorios.

Cada semana durante un lapso de 4 meses, se recolectó el medio RPMI-1640 glucosa 1% de las cajas Falcon por medio de sedimentación por gravedad y aspiración aséptica, se colectaron 8 ml aproximadamente de medio conteniendo proteínas (TES) liberadas por las L2 de *T. canis* (TES), después se reconstituyó medio de cultivo fresco a las cajas Falcon.

Con el medio colectado semanalmente se formó un lote, el cual se congeló a -20 C, después por medio de ultrafiltración con un sistema AMICON utilizando una membrana de 0.2µm, se concentró el medio RPMI-1640 glucosa 1%, se formaron alícuotas de 500µl y se almacenaron en tubos ependorf y se congelaron a -20 C hasta su utilización.

La cantidad de TES se cuantificaron por el método de Bradford (Bowman et al., 1987).

Ensayo inmunoenzimático.

Se realizó con la finalidad de demostrar la presencia y concentración de los anticuerpos dirigidos contra los TES en los sueros colectados durante todos los muestreos.

Las pruebas se realizaron por triplicado de acuerdo a la técnica descrita por Colligan et al., (1994) con algunas modificaciones.

Se sensibilizaron las placas de poliestireno de 96 pozos marca Nunc con 50 μ l de TES de una concentración de 1.25 μ g/ml durante 18 a 24 horas a 4 C, posteriormente se lavó tres veces con PBS cada 5 minutos y 1 vez con agua desionizada. A continuación se agregaron 50 μ l de tres diferentes diluciones de los sueros de conejo en PBS (1:50, 1:100 y 1:500), las placas se incubaron a 37 C durante 2 horas, enseguida se lavaron tres veces por cinco minutos con PBS Tween 20 al 0.1% y una vez con agua desionizada por 5 minutos. Posteriormente las placas fueron incubadas una hora a 37 C con 50 μ l de un anticuerpo secundario (α -IgG de conejo) marcado con peroxidasa a una dilución de 1:8000. Después de lavar tres veces con PBS-Tween 20 al 0.1% y una vez con agua desionizada, se adicionaron 100 μ l de solución desarrolladora de color (solución reguladora de citratos, OPD y agua destilada), las placas se mantuvieron en obscuridad por un periodo de 10 minutos, después se adicionaron 50 μ l de solución de ácido 0-fosfórico al 6% para detener la reacción, se agitaron las placas por 25 segundos y se leyeron en un lector de ELISA Multiskan AFCENT a una longitud de 492nm.

Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE).

Para la caracterización del perfil de proteínas de los diferentes tipos TES se utilizaron geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), la separación de los componentes protéicos se llevó a cabo con algunas modificaciones por el método descrito por Laemli en 1970.

Se preparó un gel separador de acrilamida al 10%, 0.375 Tris de pH=8.8 y un gel concentrador de acrilamida al 4% 0.125M Tris de pH=6.8 por medio de una cámara de electroforesis Mini-Protean II electrophoresis cell (Bio-Rad Labs.), el tamaño del gel fue de 7 cms de largo, 8 cms de ancho y 0.5mm de espesor, se corrió los productos por triplicado con un carril de comparación con marcadores de peso molecular (MPM) preteñidos a 120 V con 120mA para el gel concentrador por 15 minutos aproximadamente y a 100V con 70 mA para el gel separador durante 75 minutos.

Una vez terminado el corrimiento electroforético se realizó una tinción con nitrato de plata; los pesos moleculares (PM) de los antígenos obtenidos se determinaron por medio de una curva patrón, graficando el logaritmo del PM de los marcadores preteñidos contra su migración electroforética a través del gel expresado en centímetros. Los PM de los marcadores fueron: Miosina 203kDa, β -galactosidasa 118kDa, albumina sérica bovina 86kDa; ovoalbumina 51kDa, anhidrasa carbónica 34kDa, inhibidor de la Tripsina 29kDa, lisosima 19kDa y aprotinina 7.5 kDa para utilizarlos posteriormente en el ensayo de electrotransferencia.

Transferencia de TES a una membrana de nitrocelulosa.

Esta se empleó para determinar el reconocimiento de las bandas correspondientes a los diferentes TES en cada período de obtención de los sueros.

Se utilizó un equipo Trans-Blot Sem-Dry Electrophoretic Transfer Cell para electrotransferencia semiseca que consta de dos platos de electrodo de carbón. Se limpiaron los dos platos con agua destilada; se cortaron piezas de papel de nitrocelulosa al tamaño de los geles de poliacrilamida y ambos se colocaron entre capas de papel filtro Wathman 0.2µm sumergidos en amortiguador de transferencia. Los antígenos separados por electroforesis se transfirieron a 12 V con una corriente de 0.3 mA/cm₂ por un tiempo de 45 minutos. La transferencia de los TES fue verificada por la presencia en la membrana de nitrocelulosa de los marcadores de peso molecular preteñidos. La membrana se bloqueo con Tris-buffer salino al 5% de leche descremada en polvo a 4 C por toda la noche.

Western Blot (Inmunodetección (ID))

Una vez bloqueada la membrana de nitrocelulosa, se cortó en tiras de 5 mm y se sometió a incubación por 2 horas con los sueros obtenidos de los conejos a una dilución 1:20 en PBS al 3% de leche descremada, después se realizaron lavados con PBS-Tween 20 al 0.1% 5 veces por 3 minutos, posteriormente se incubaron con el conjugado de conejo α-IgG marcado con peroxidasa por 2 horas, se realizaron 7 lavados por 1 minuto con PBS-Tween 20 al 0.1%, después se realizó el revelado con una solución de H₂O₂ al

0.01% (v/v), 4 -cloro.1-n-naftol 0.05% (p/v) en MeOH 16.6% en PBS 0.1M, durante 15 a 30 minutos. Cuando se hizo evidente la reacción por la aparición de bandas se lavaron las membranas con agua destilada y se secaron sobre un papel filtro.

Las tiras transferidas que contenían los marcadores de peso molecular, así como las bandas reconocidas por los componentes del suero de conejo, se escanearon y las imágenes fueron analizadas en el programa Microsoft Photo Editor, en el cual se midió la migración de las bandas. Con los datos de los pesos moleculares de los productos problema y el logaritmo de los pesos moleculares conocidos de los marcadores moleculares se realizó una curva patrón, colocándose en el eje Y los logaritmos y en el eje X su migración o nivel de desplazamiento a través del gel en milímetros, después se interpolaron los datos de las bandas de los sueros de los conejos para así obtener el peso molecular de cada banda y por referencia determinar cuales eran los antígenos que identificaba el suero de conejo infectado.

Pruebas inmunohistoquímicas

Este proceso se estableció modificando la técnica descrita por Beesley en 1993, que incluyen los siguientes pasos:

Desparafinado.

Las muestras se incubaron 15 minutos en estufa bacteriológica a 60 °C para fundir la parafina en la que

estaban incluidas. Posteriormente, se pasaron a una primera inmersión en xilol durante 15 minutos, en seguida a una segunda inmersión en xilol por 5 minutos y finalmente una tercera inmersión en xilol por 5 minutos. Posteriormente se depositaron en una mezcla de xilol-alcohol etílico absoluto por 5 minutos.

Hidratación.

Se sumergieron las muestras en alcohol etílico absoluto por 5 minutos, en alcohol etílico al 96% por 5 minutos, en alcohol etílico al 80% por 5 minutos, en alcohol etílico al 70% por 5 minutos y finalmente se depositaron en vasos de Coplin en solución de buffer de fosfatos (PBS) por 15 minutos quedando listas las muestras para iniciar el procesamiento inmunohistoquímico.

Proceso Inmunohistoquímico.

Todos los pasos de este proceso se desarrollaron en el interior de recipientes de vidrio con atmósfera de elevada humedad relativa (cámaras húmedas) la cual se lograba con hojas de papel absorbente impregnadas con aproximadamente 10 ml. de agua común y en todos los pasos de incubación los recipientes se mantenían cerrados para evitar deshidratación que afectará la secuencia de la reacción.

Digestión.

Con la finalidad de exponer los determinantes antigénicos que se pretenden marcar, se cubrieron las muestras con 200 µl de una solución de tripsina al 0.01 % y se incubaron durante un período de 15 minutos. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS incubando por dos minutos en cada uno de ellos.

Bloqueo.

Esta fase del proceso se incluye con la finalidad de eliminar todos aquellos componentes, ya sea de los tejidos o de los reactivos empleados, que puedan generar alguna interferencia con la reacción y dar un marcaje inespecífico. Se realizaron tres bloqueos de la muestras.

Primer bloqueo: Se incubaron las muestras con 100 µl de peróxido de hidrógeno al 3% para eliminar reacciones inespecíficas de peroxidasas endógenas (LSAB+SYS, HRP Dako Corporation) por 20 minutos. Posteriormente se lavaron tres veces con PBS con intervalos de dos minutos cada uno.

Segundo bloqueo: Se incubaron las muestras con 200 µl de ovoalbumina en solución de buffer tris tween (TBS-T) por 10 minutos. Se lavaron tres veces con PBS a intervalos de dos minutos cada uno.

Tercer bloqueo: Se incubaron con 200 µl de suero normal de cerdo sin diluir por 20 minutos. Posteriormente se lavaron las muestras tres veces con PBS con intervalos de dos minutos cada uno.

Incubación con anticuerpo primario

Las muestras se incubaron con 200 µl de suero de conejo infectado experimentalmente con larvas de *T. canis* a una dilución 1:2000 por dos horas para realizar el marcaje de antígenos en los tejidos de los animales inoculados, posteriormente las muestras se sometieron a tres lavados con PBS con intervalos de dos minutos cada uno.

Incubación con anticuerpo secundario

Las muestras se incubaron por 15 minutos con 100 µl de un anticuerpo biotinilado producido en cabra con capacidad para reconocimiento de anticuerpos de ratón, conejo o cabra (anticuerpo secundario LSAB+SYS HRP Dako Corporation) con la finalidad de hacer el marcaje del anticuerpo primario, posteriormente las muestras se sometieron a tres lavados con PBS con intervalos de dos minutos cada uno.

Incubación con conjugado de anticuerpo-biotina-estreptavidina-peroxidasa.

Las muestras se cubrieron e incubaron por 15 minutos con 100 µl del complejo biotina-estreptavidina-peroxidasa de rabano en PBS (LSAB+SYS HRP Dako Corporation) para formar el complejo estreptavidina-peroxidada-biotina y hacer factible evidenciar la reacción inmune. Posteriormente las muestras se sometieron a tres lavados con PBS a intervalos de dos minutos cada uno.

Revelado de la reacción en las muestras.

Las muestras se cubrieron con 100 µl de una mezcla de sustrato amortiguado de peróxido de hidrogeno y 3'3'diaminobenzidina (cromógeno DAB) a ph 7.5. Inicialmente hay una coloración amarilla en la muestra, que se va tornando primero café claro y después café oscuro. Alcanza su máxima oscuridad a los 30 a 90 segundos posteriores a la aplicación del reactivo, este paso se desarrolló bajo observación al microscopio para vigilar su evolución y evitar un depósito excesivo de cromógeno. Cuando la muestra tomo un color café se paro la reacción eliminando el exceso de reactivo sacudiendo las muestras en papel absorbente y lavando en PBS en vasos de Coplin por un lapso de 15 minutos (Beesley ,1993).

Contrastado.

Se realizó con la finalidad de colorear los tejidos y permitir una diferenciación de las áreas en las que ha ocurrido el marcaje de complejos. Las muestras se sumergieron en una solución de hematoxilina por un lapso de 15 segundos. Después se enjuagaron con agua durante uno o dos minutos para eliminar el exceso de colorante. Se aclararon las muestras con cuatro o cinco inmersiones en una solución viradora de carbonato de litio al 1% durante un segundo cada una.

Conservación permanente: Las muestras se sumergieron sucesivamente en alcohol al 70%, 80%, 96%, alcohol absoluto, alcohol-xilol por cinco minutos cada una y

finalmente en tres veces en xilol absoluto. Finalmente a las muestras se les aplicó resina sintética y un cubreobjetos quedando de este modo listas para su observación y evaluación.

Interpretación de las inmunohistoquímicas.

Los cortes de los tejidos procesados se interpretaron y analizaron en un microscopio Olympus BX60, con una cámara digital (Hitachi KP D581) se obtuvieron de imágenes que evidenciaban la presencia de las reacciones positivas por la presencia de la coloración característica o negativas según el tipo de muestra.

Todas las imágenes fueron analizadas y evaluadas cronológicamente para integrar la información que se presenta en este trabajo de acuerdo con la evolución y los órganos estudiados.

RESULTADOS.

Obtención y mantenimiento de larvas infestantes.

Se obtuvieron 8 cajas Falcon con aproximadamente 80,000 larvas viables cada una, las cuales se mantuvieron por un período de cuatro meses en condiciones de esterilidad y con un bajo porcentaje de mortalidad.

Obtención de TES.

Semanalmente se colectó un promedio de 64 ml de sobrenadante, que llegó a un volumen aproximado de 500 ml, los cuales se concentraron hasta reducir el volumen a 20ml y el análisis determinó una concentración de 100µg/ml de proteína.

Electroforesis de proteínas.

En la electroforesis se detectaron 11 bandas de los sobrenadantes de los cultivos de larvas en medio RPMI-1640 que ya teñidos con Nitrato de Plata correspondieron a los siguientes pesos moleculares: 16, 23, 24, 28, 32, 35, 38, 120, 200 y tres bandas de menos de 7.5 kDa., las más intensamente marcadas fueron las de 23 y 24 kDa, el patrón electroforético puede observarse en la figura 6.

Prueba de ELISA.

Los sueros obtenidos de los conejos fueron titulados por ELISA. Se muestran en la gráfica 1 y cuadro 5, en estos se muestra que los títulos de anticuerpos contra TES en el

suero de los conejos empieza a aumentar ligeramente a partir del 8 d.p.i., entre los 8 y 15 d.p.i. se presenta un notable incremento en la producción de anticuerpos. A partir de 22 d.p.i. y hasta el 64 d.p.i. se observó una ligera disminución de la absorbancia. A partir de 71 d.p.i. y hasta el último muestreo se mantuvo título de anticuerpos. Para comparar las tres diluciones de suero utilizadas, se realizó una prueba de análisis de varianza, en ella no se observaron diferencias estadísticas entre las tres diluciones suero utilizadas ($\alpha=0.05$) en virtud de que se producen elevadísimas concentraciones de anticuerpos (Hurley, 1980).

Western Blot.

Se observó un reconocimiento secuencial de los antígenos, a partir del día 15 se reconoce una banda de 66 kDa de PM. El día 22 se reconocen dos bandas, estas con PM de 55 y 66 kDa. Entre los días 29 y 50 p.i. se reconocen bandas de 32, 35, 45, 55, 66 y 120 kDa. A partir del día 57 y hasta el final de las observaciones (día 127p.i.) se observaron bandas de 32, 35, 45, 55, 66, 120 y 400 kDa de PM (figura 8).

En función a los resultados de las pruebas a las que fue sometido el suero de los conejos infectados con larvas de *Toxocara canis*, fue viable su uso como anticuerpo primario para el desarrollo de la prueba inmunohistoquímica con las muestras de los jerbos inoculados con larvas de *Toxocara canis*.

Figura . 6

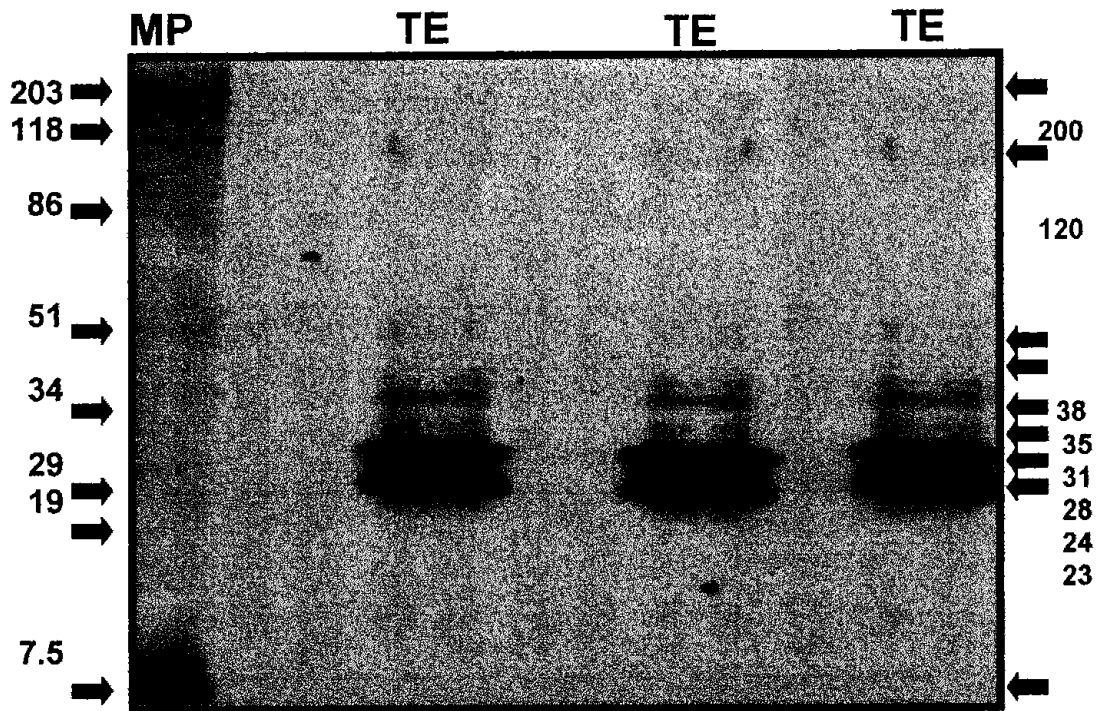
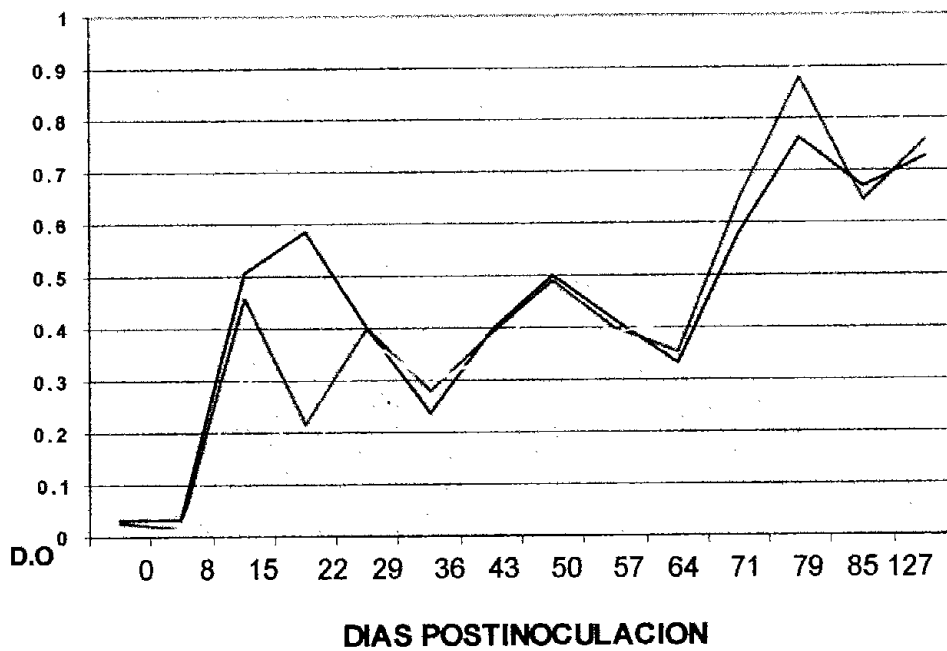


Figura No 6. Separación de TES de larvas de *Toxocara canis* por electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida teñidos por la técnica de Nitrato de Plata, del lado izquierdo se encuentran los marcadores de peso molecular, en el lado derecho el peso molecular de los TES.

Gráfica Número 1



D.O.=Densidad óptica.

Dilucion 1:50 ■ , Dilución 1:100 ■ , Dilución 1:500 □

Figura No. 7 Cinética de producción de anticuerpos circulantes detectados por ELISA contra TES de larvas de *Toxocara canis* en cinco conejos inoculados experimentalmente con 5,000 huevos larvados , en la gráfica se presentan los resultados de usar diferentes diluciones de los sueros.

DIAS	DILUCION 1:50	DILUCION 1:100	DILUCION 1:500
0	0.0302	0.0244	0.0114
8	0.0333	0.0142	0.0146
15	0.5041	0.4591	0.3156
22	0.5838	0.2174	0.1196
29	0.4011	0.3981	0.3772
36	0.2362	0.2781	0.2968
43	0.3962	0.3914	0.3476
50	0.5021	0.4875	0.4658
57	0.4177	0.3985	0.3873
64	0.3318	0.3508	0.4098
71	0.5792	0.6432	0.6978
78	0.7656	0.8784	0.9282
85	0.6688	0.6411	0.7056
127	0.7242	0.7558	0.8598

CUADRO 5. Promedio de los valores de absorbancia detectados por ELISA empleando TES y sueros de conejos infectados experimentalmente con 5,000 huevos larvados de *T. canis*.

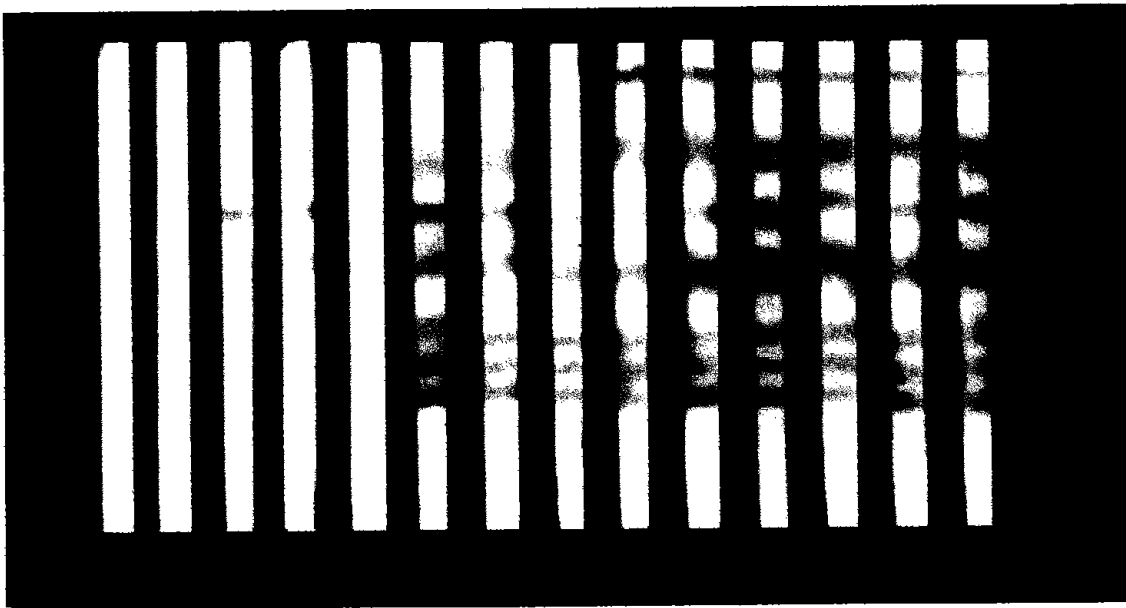


Figura 7 Bandas reconocidas por el suero de conejos inoculados con 5,000 huevos larvados de *Toxocara canis* en los diferentes períodos de muestreo observándose el reconocimiento gradual de los diferentes antígenos producidos por las larvas.

DESCRIPCION DE LAS LESIONES MACROSCOPICAS,
MICROSCOPICAS Y MARCAJE EN PRUEBAS
INMUNOHISTOQUIMICAS.

Intestino.

Día 2 Posinoculación.

Se observaron varias zonas con hemorragias pequeñas, en la pared intestinal de los animales, particularmente en la curvatura mayor del ciego con aspecto de estrías transversales, había dilatación y adelgazamiento de su pared con cambios de coloración Figura 8. A nivel microscópico se observaron larvas en la pared intestinal, inmersas en lámina propia en una masa de células inflamatorias con elevada concentración de mononucleares (macrófagos), mezclados con polimorfonucleares (neutrófilos) y linfocitos Figura 9 y 10, con pérdida de estructura del tejido y distorsión del mismo, en algunas áreas se presentaban muy extensas y severas. Las larvas cortadas transversalmente, estaban integradas en el tejido y presentaban marca bien definida de antígenos parasitarios en su interior que se hacía más tenue en la periferia, con un espacio alrededor ocupado por una coloración café más clara que correspondía a la marca de los TES del parásito Figura 10.

Día 5

Microscópicamente se observaron zonas hemorrágicas en la curvatura mayor de ciego encontrado el día 2, también se presentaron lesiones en intestino delgado, de aspecto más

marcado (una coloración roja intensa), de forma circular definida con un diámetro de 1 y 3 mm aproximadamente, microscópicamente había zonas con procesos inflamatorios con predominio de polimorfonucleares mezclados con mononucleares extendidas en la pared por debajo de las vellosidades Figuras 9 y 10, estas lesiones también se observaron en los animales sacrificados el día 10 pero ya sin detección de larvas Figura 11.

En el ensayo inmunohistoquímico de estas muestras fue posible observar la presencia de larvas con marca muy definida a nivel somático, que habían profundizado en la pared intestinal y se ubicaban en las capas musculares, observándose a su alrededor un espacio en el habían desaparecido los componentes celulares, aparentemente degradados y la presencia de una gran concentración de antígeno marcado superficialmente y la difusión del mismo hacia la profundidad del tejido, en esta zona no se observó la presencia de ningún tipo de célula asociada a respuesta inflamatoria contra el parásito Figuras 10 y 11.

Hasta el d.p.i. 10 se observaron lesiones severas en el intestino ya sin presencia de larvas o marca de antígeno.

Hígado.

Día 2

Macroscópicamente esta víscera no presentó cambios de coloración o estructura que sugirieran la presencia o desplazamiento de larvas en su migración regular Figura 14. Sin embargo a nivel microscópico se observaron una gran cantidad de zonas con focos granulomatosos adyacentes a la cápsula, con infiltrado discreto de macrófagos y

polimorfonucleares (neutrófilos y eosinófilos). La presencia de degeneración vacuolar adyacente, además de necrosis coagulativa (presencia de células sin núcleo), las lesiones se asociaban a los trayectos migratorios de las larvas (figura 14), dejando como secuela la distorsión local del tejido cuando se presentaban cerca de la cápsula. También fueron observadas en el parénquima interno de la víscera, variaciones en la composición de células en la reacción inflamatoria y siguiendo diversas disposiciones (en algunos casos se observaba una lesión con un eje alargado aparentemente siguiendo el desplazamiento de las larvas y en otros casos correspondía a cortes transversales de esas trayectorias) Figura 15. Se detectaron varias piezas de tejido con larvas presentes en cortes transversales o diagonales ,siempre en éstos, los organismos estaban inmersos en zonas infiltradas con células inflamatorias y eosinófilos o se presentaban en la periferia de estas pareciendo estar desplazándose de ellas (escapando aparentemente). Las larvas mostraban una marca muy intensa a los antígenos somáticos y en el tejido inmediato en contacto y su difusión como TES haciéndose más tenue en zonas alejadas, que correspondían hasta a tres veces el diámetro de las larvas, en otros se observó que esa marca formaba un trayecto cuya intensidad se reducía gradualmente al alejarse Figura 16.

Día 5

Sólo se observaron ligeras alteraciones macroscópicas en esta víscera que consistieron en pequeños puntos blancos con un diámetro muy pequeño de uno o menos de un mm. en este período, microscópicamente se siguió percibiendo la presencia de los mismos tipos de lesión y distribución de

componentes celulares, con el aparente inicio de organización de granulomas en las áreas que habían sido ocupadas por las larvas y estas se situaban en el exterior de las lesiones. Se observaron larvas marcadas a nivel somático y de TES alrededor del mismo, formando una cauda que se atenúa gradualmente dejando marca por el tejido. A mayor aumento se observó la presencia de marca diluida en el centro y periferia de ese foco de inflamación Figura 17.

Día 10

Se observó el mismo patrón de lesiones detectado en el día cinco, incrementándose su número, sin observación de larvas en ninguna de las muestras.

Día 15

Se observaron los mismos tipos de lesión macroscópica y microscópica ya descritos, notándose el hecho de que aquellas presentes en los tejidos cercanos a la cápsula provocaban la retracción del mismo. Y mantenían el mismo patrón de componentes celulares. Las larvas encontradas en zonas inflamadas presentaban una intensa marca somática, con la presencia de una reducida cantidad de TES que apenas marcan las superficies de contacto con los tejidos en la zona, con muy escasa difusión al conglomerado celular Figura 18.

Día 20, 25, 30 y 35.

No se observaron cambios macroscópicos, repitiendo el patrón microscópico de alteraciones observadas en los días previos.

Días 40, 45, 50, 55 y 60.

No se observaron alteraciones macroscópicas, sin embargo en las microscópicas la estructuración de granulomas ya con la aparición de fibroblastos para delimitarlos, sin presencia de larvas Figura 19.

Pulmones.

Día 2

Macroscópicamente se observaron reacciones hiperémicas generales, hemorragias equimóticas en número reducido (dos o tres) distribuidas en la parte media del lóbulo caudal. Histológicamente esas áreas correspondían a lesiones necróticas peribronquiales y perivasculares, con abundancia de mononucleares (monocitos), neutrófilos y eosinófilos en el intersticio alveolar. Alrededor del acúmulo se observaba edema con infiltrado polimorfo nuclear intersticial Figura 20.

No se detectó la presencia de larvas.

Día 5

Se observaron múltiples lesiones hemorrágicas en la superficie de los pulmones, que van del tipo petequiral a las sufusiones. En algunas piezas se funden e involucran grandes áreas de tejido y el grado de afección iba de 30 al 80% del tejido superficial Figura 21. A nivel microscópico se observaron zonas internas y superficiales de necrosis, las internas eran peribronquiales y perivasculares con acúmulos de células de dimensión variable en los que se presentaba una composición mayoritaria de mononucleares (monocitos), neutrófilos y eosinófilos en el intersticio

alveolar y edema, algunos presentaban ya una estructuración para integrar un proceso granulomatoso, otras eran de estructura irregular, también se observó edema y engrosamiento de los septos, indicador de la presencia de neumonía intersticial aguda Figura 22.

Día 10

La intensidad de coloración disminuyó en las zonas hemorrágicas, manifestando una difusión superficial de coloración rojiza en ambos pulmones, la superficie de los órganos fue rugosa, las zonas lesionadas formaban depresiones y el proceso en apariencia tendió a la involución, y las grandes áreas de tejido se vieron involucradas. Microscópicamente se repitió el patrón de lesiones observadas previamente. En estos tejidos se observó la presencia de larvas en parénquima, incluidas en la reacción inflamatoria, en la que los alvéolos prácticamente desaparecieron con una disparidad en lo que refiere a marca de los TES, una de ellas cortada transversalmente presentó una reducida concentración de estos productos alrededor, no obstante, después de una intensa marca en la superficie de los tejidos con los que hacía contacto había una zona reducida de difusión hacia el tejido, en tanto en la misma área se observaba otra larva cortada diagonalmente ubicada en el centro de la zona, inmersa en las células inflamatorias, además de tener marca somática se presentaba la difusión de una gran cantidad de TES.

Día 15

Los órganos mostraban lesiones macroscópicas dimensiones variables pero con tendencia a la reparación, esto se evidenciaba por la disminución marcada de la intensidad de las hemorragias, apareciendo una coloración rosa en ellas respecto a los pulmones de animales de los días cinco y diez , se observaba un cambio en la superficie de las áreas lesionadas protuberantes. Microscópicamente se presentaba el mismo patrón de lesiones tanto en la zona periférica, como en la profundidad del tejido . Se observaba adicionalmente la presencia de huevos que fueron aspirados por los animales y desencadenaron una respuesta inflamatoria localizada, que los rodeaba, caracterizada por la presencia de mononucleares y eosinófilos, el cascarón del huevo estaba intensamente marcado, así como las superficies tisulares que estaban en contacto al igual que la larva en su interior, observándose la presencia de una pequeña cantidad de TES difundida en los polos del huevo Figuras 25 y 26.

Día 20

La persistencia de las lesiones se observaba con un importante proceso de recuperación, reflejado en mayor disminución de tinte hemorrágico, cambiaba hacia coloración amarillenta, la superficie de los órganos es irregular debido a las protuberancias producidas por las lesiones. Microscópicamente se observó la persistencia de las lesiones tanto en el interior como en la superficie de los tejidos que componen el órgano, la respuesta inflamatoria se vió más organizada con la aparición de fibroblastos que la empezaban a delimitar, se observaron huevos larvados aspirados por los animales que se

presentaban integrados al parénquima, asociándose a ellos una violenta respuesta inflamatoria que afectaba amplias zonas de tejido alveolar, que presentaban infiltrado primariamente formado por mononucleares y secundariamente por neutrófilos y eosinófilos. Los huevos larvados presentaban marca externa e interna, observándose difusión de TES hacia el sector de la zona inflamatoria y la zona no inflamada Figura 25.

Días 25 y 30,

Los patrones macroscópicos y microscópicos se repiten Figuras 24, 27 y 28.

Día 35

Las alteraciones macroscópicas fueron menos visibles debido a un retorno casi a la pigmentación normal con ligero tinte amarillento, algunas hemorragias dispersas (dos o tres focos) en la superficie, mientras el patrón de lesiones microscópicas se mantiene con la aparición de fibroblastos en las zonas periféricas a las mismas Figura 29.

Día 40

Las Alteraciones macroscópicas fueron poco visibles casi con pigmentación normal, con tonalidades amarillentas más marcadas y sin hemorragias. El patrón de lesiones microscópicas se hizo más definido hacia la estructuración de granulomas delimitados, con centro saturado de macrófagos, la capa más externa estaba formada por una

mezcla de macrófagos con fibroblastos. El exterior de esas lesiones se observaban nuevas capas de neutrófilos y eosinófilos, estas ya son consideradas lesiones de tipo crónico, que en el centro presentan acúmulos de TES marcados formando granulaciones Figuras 30 y 31.

Días 45, 50, 55 y 60.

Las características observadas macro y microscópicas, fueron semejantes a las del día 40, con un incremento en la presencia de una coloración amarillenta que apareció en forma de parches.

Riñón.

Día 2

Las lesiones macroscópicas no se observaron, pero sí a nivel microscópico con focos inflamatorios en los que predominaban los mononucleares y en menor proporción neutrófilos y eosinófilos, con tendencia a focalizarse. Las dimensiones fueron grandes en general, presentes en su mayoría en el interior del órgano y con menor frecuencia en la cápsula, en la que no presentan el nivel de organización de las interiores. Algunas de estas zonas presentan pigmentación sugerente de la presencia de TES Figuras 32 y 33.

Día 5.

Se repite el patrón observado en el grupo sacrificado a los dos días con presencia de mayor número de lesiones focalizadas en la cápsula. Se observó la presencia de larvas integradas a los tejidos, con marca somática y poca

difusión de TES. Se observaron algunas áreas con depósitos marcados, sin presencia de larvas que sufrieron cambios, ya que además de material difundido se observaba la presencia de gránulos con marca intensa, que coincidiendo con la presencia de un foco necrótico, sin presencia de respuesta inflamatoria y con tumefacción celular.

Día 10.

Las lesiones macroscópicas consistieron en puntos blancos protuberantes sobre la cápsula, de dimensión variable (de hasta 1 mm de diámetro), que se presentaban en gran cantidad. Se observaron zonas de inflamación focal en el interior del órgano con un patrón semejante al descrito para el día 5, también las lesiones a nivel capsular con ruptura de la misma y emergencia de larvas, presentaron respuesta inflamatoria, en la que predominan los mononucleares y eosinófilos, de estructura irregular y con un gran fragmento del organismo. En un corte del plano inferior se logró detectar la marca de algunas porciones del cuerpo de la larva y un importante infiltrado de TES en la zona. Además, se observó en una lesión interior una larva casi entera, con plena marca somática y una discreta difusión de TES marcado hacia el tejido periférico. Aparentemente se trata de un organismo en trayecto hacia la cápsula del órgano que se encuentra rodeada de una reacción inflamatoria intersticial de composición mixta (mononucleares-polimorfonucleares) no organizada, ya que existía una dispersión en el parénquima involucrando una gran cantidad de tejido Figuras 34, 36 y 37.

Día 15

Se mantuvo el patrón de las lesiones macroscópicas observadas en el día 10, se detectó un incremento en su densidad. A nivel microscópico se mantuvo el patrón de lesiones tanto internas como externas, con estructura irregular y focalizada, se observaron larvas que presentan marca de antígenos somáticos y TES con difusión de éstos al tejido renal.

Día 20

Microscópicamente se observó un incremento en la cantidad de lesiones puntiformes blancas que tendían a volverse irregulares en forma, aparentan ser superficiales, y alcanzan dimensiones mayores a las observadas hasta el momento. El patrón de alteraciones microscópicas se mantuvo observándose lesiones internas recientes y no organizadas, así como áreas granulomatosas perfectamente focalizadas con presencia de larvas con marca somáticas y abundante depósito de infiltrado intersticial con una composición porcentualmente mayor de macrófagos y menor de neutrófilos y eosinófilos. También se observó la presencia de TES alrededor de los organismos con abundante difusión de los mismos en toda la zona, formando depósitos en forma de gránulos libres. Resaltó el hallazgo de lesiones granulomatosas que presentaban gran concentración de TES en su porción central Figura 35 , 36 y 39. Se observó además la presencia de una larva bajo la cápsula renal que estaba a punto de romperse para liberarla, el cuerpo de esta larva presentaba marca somática existiendo, además de marca intensa en los tejidos que contactan con dicha larva y una ligera difusión a los tejidos subyacentes, sin la presencia de ninguna respuesta inflamatoria Figura 40.

Día 25

Las lesiones macroscópicas superficiales disminuyeron en número, las dimensiones son contrastantes, existiendo algunas muy pequeñas que iban desde 0.3 a 0.5 mm. hasta aquellas de 2 mm. Son blanco-amarillentas protuberantes y sobre todo las grandes tendían a presentar formas irregulares. A nivel microscópico el patrón de lesiones fue semejante a los encontrados en los días precedentes.

Días 30, 35 y 40

En los órganos de esta etapa se observaban áreas blancas presentes en la superficie se hicieron más grandes, e irregulares, con protuberancias, el tejido en las zonas en las que se habían desarrollado esas se observó retraído y se redujó su número. A nivel microscópico se percibía la existencia de lesiones granulomatosas bien definidas con la misma organización descrita previamente, la presencia de larvas marcadas somáticamente y la existencia de infiltrado de TES que de hecho delimitaba la zona, además este material se depositó en forma de gránulos dispersos en varias áreas. Las lesiones se observaban tanto en la zona periférica de los órganos, como al interior, aquellas periféricas que aparecían bajo la cápsula se proyectaban al exterior presentando larvas atrapadas y marcadas Figura 42.

Día 45

En los órganos de esta etapa se observa que las áreas blancas presentes en la superficie se hacen más grandes con un patrón semejante al del día 40, microscópicamente la persistencia de lesiones granulomatosas bien definidas con la misma organización descrita previamente, con la presencia de larvas marcadas somáticamente y la existencia de infiltrado de TES que de hecho delimita la zona. Las lesiones se ven en la zona periférica de los órganos, presentando un alto grado de fibrosis persistiendo la presencia de macrófagos, neutrófilos y eosinófilos Figura 44

Día 50 y 55.

En los órganos de esta etapa se mantuvieron áreas blancas de gran dimensión en la superficie con un patrón semejante al del día 40, microscópicamente la persistencia de lesiones granulomatosas bien definidas con la misma organización descrita previamente, no se observaron larvas en las muestras procesadas Figuras 41 y 42.

Día 60

Las alteraciones macro y microscópicas fueron semejantes a las de la fecha previa, con presencia de larvas marcadas y difusión de TES en los granulomas detectados Figura 45.

Cerebro.

Las larvas en el cerebro se comenzaron a detectar a partir del día 10 y no se observaban macroscópicas, las larvas estaban inmersas en él sin presencia aparente de una respuesta inflamatoria en el área invadida, mostraban marca somática y de TES con una importante difusión de estos, que, en algunos casos forman una estela de dimensión variable en el tejido Figura 53. En algunas áreas que presentaban larvas se observaba un aspecto muy esponjoso del tejido alrededor de su ubicación. También se observaron zonas de tejido con depósito de TES difundidos en él, pero que mostraban una elevada concentración (el tejido aparentemente correspondía con un punto en el que ha ocurrido una migración larvaria recientemente) con la formación de gránulos y sin una respuesta inflamatoria aparente Figura 53.

Día 15.

Las alteraciones macroscópicas no se observan en esta víscera, tenían un patrón semejante al del día 10 en cuanto a la presencia de larvas, ausencia de lesiones definidas y marcaje somático, así como difusión de TES en los tejidos.

Día 20

Las lesiones macroscópicas en esta víscera no se observaron, detectándose larvas desplazándose por este tejido, con marca de reacción a los antígenos somáticos, persistiendo el patrón de liberación de TES con una gran difusión por los tejidos, formando estelas en los sitios que ocurre el desplazamiento Figura 56.

Días 25, 30, 35 y 40.

Las lesiones macroscópicas no se notaron y se mantuvo el patrón de presencia de larvas marcadas, y con amplia difusión de TES en la periferia de las zonas de asentamiento Figura 54 y 55.

Día 45

Las lesiones macroscópicas no se notaron y se mantuvo el patrón de presencia de larvas marcadas y con amplia difusión de TES en la periferia de las zonas de asentamiento. La presencia de larvas se observó asociada al inicio de una reacción inflamatoria crónica, que se iba a estructurar como granuloma del que la larva aparentemente había escapado. Esa zona mostraba un infiltrado con TES bien marcado mientras la larva se había desplazado a corta distancia. También se observaba una gran difusión de material antigénico alrededor del organismo, además se detectó la presencia de un granuloma estructurado con presencia de mononucleares e infiltrado de TES bien marcado y en forma de gránulos. Se detectó la presencia de una larva situada a un lado de un vaso sanguíneo, estaba marcada somáticamente y mostraba una gran difusión de TES hacia la periferia de su zona de implantación. La pared vascular estaba engrosada con presencia de células inflamatorias (monocitos y polimorfonucleares) orientadas hacia el punto de implantación, los TES liberados por la larva se estaban extravasando con alguna cantidad en la luz vascular y un poco en el interior de las células inflamatorias. La pared vascular presentaba algún grado de

distorsión asociada a la presencia de la larva Figuras 58 y 59.

Día 50

Las lesiones macroscópicas y microscópicas no se observaron, se mantuvo el patrón de presencia de larvas marcadas y con amplia difusión de TES en la periferia de sus zonas de asentamiento, así como áreas de desarrollo de reacciones granulomatosas con infiltrado de TES bastante intenso bien marcado, incluso granular.

Día 55

Las lesiones macroscópicas y microscópicas no se observaron, se mantiene el patrón de presencia de larvas marcadas y con amplia difusión de TES en la periferia de sus zonas de asentamiento, así como áreas de desarrollo de reacciones granulomatosas con infiltrado de TES bastante intenso bien marcado, incluso granular.

Día 60

Las lesiones macroscópicas y microscópicas no se observaron, se mantiene el patrón de presencia de larvas marcadas y con amplia difusión de TES en la periferia de sus zonas de asentamiento.

Músculo esquelético.

Días 15, 20 y 25

No se observaron alteraciones macroscópicas ni microscópicas, pero si la presencia de alteraciones

relacionadas con estas o evidencias del depósito de TES en este tejido.

DIA 30.

Las alteraciones macroscópicas aparentes no se observaron, microscópicamente se notaron dos tipos de evento: 1- presencia de larvas a tejido muscular con marca somática y muy ligera difusión de TES hacia los tejidos vecinos, las zonas a las que ingresa, aún con la destrucción asociada a la migración presentaban alteraciones muy leves asociadas con el desarrollo de una respuesta contra este organismo, lo cual en apariencia evidenciaba el comportamiento de un tejido recién invadido. 2- en otras muestras sin embargo se apreciaba áreas de inflamación crónica con procesos granulomatosos, totalmente desarrollados con un depósito de material antigénico infiltrado entre las células inflamatorias que, incluso formaban granulaciones y estaban plenamente delimitadas por fibroblastos Figura 47.

Días 35, 40 y 45.

No se observaron alteraciones macroscópicas no obstante se detectó un foco inflamatorio con infiltrado de macrófagos y eosinófilos, sin presencia de larvas en ninguna muestra pero se observa marca de TES Figura 48.

Día 50.

No se observaron alteraciones macroscópicas sin embargo, a nivel microscópico se notaba la presencia de larvas incluidas en áreas de respuesta inflamatoria crónica en la que dichas larvas estaban situadas centralmente, rodeadas por una gran concentración de macrófagos, neutrófilos y eosinófilos en mucha menor proporción. La zona esta

delimitada por una capa de fibroblastos, se notaba que los organismos presentan marca somática y el conjunto de células en el centro contenía gran cantidad de TES marcados infiltrados en el conjunto, con alguna porción de este material fagocitado o en forma de gránulos extracelulares Figura 49 y 50.

Día 55 y 60.

No se observaron alteraciones macroscópicas, ni lesiones microscópicas, ni larvas en las muestras estudiadas.

Ojo

En las muestras de los ojos no se detectaron larvas del parásito.

FIGURAS DESCRIPTIVAS.



Figura 8. Lesión en intestino de un animal sacrificado a los 2 días postinfección (d.p.i), sobre la curvatura mayor del ciego la presencia de hemorragias tipo sufusión, dilatación de la estructura con adelgazamiento de la pared (cambio de coloración de ésta).

Figura 9. Corte sagital del ciego de un jerbo sacrificado 2 d.p.i., en el que se aprecia en lámina propia de las criptas acumulaciones de células, en su mayoría macrófagos, algunos linfocitos y polimorfonucleares, en la parte inferior del acúmulo se observan la presencia de varias porciones de una larva con marca de antígenos que aparece sólo en el cuerpo de la misma, no se observa TES en el tejido (Preparación por técnica inmunohistoquímica (PTI), 10X).

Figura 10. Preparación anterior a mayor aumento (40X), aquí es perceptible la presencia de material que difunde del cuerpo de las larvas y corresponde a los TES alrededor de ella y hacia el lado derecho (PTI, 40X).

Figura 11. Capa muscular del intestino de un jerbo sacrificado a los 5 d.p.i., con una larva marcada, con distensión del tejido en zona de implantación, en la superficie de contacto presenta marca intensa y difusión de la misma a corta distancia (PTI, 40X).

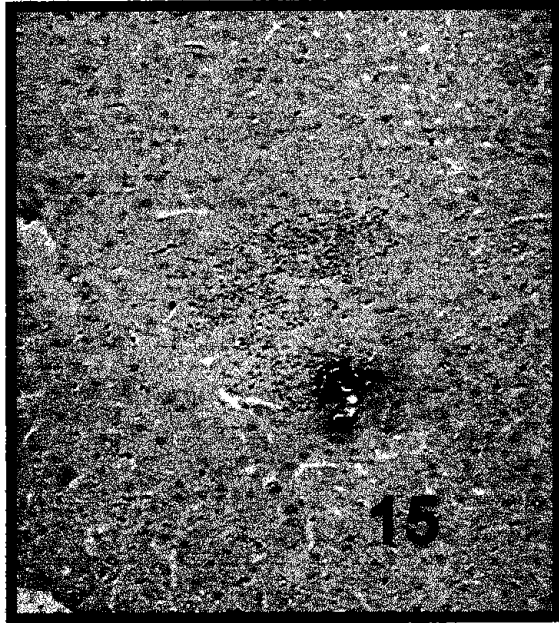
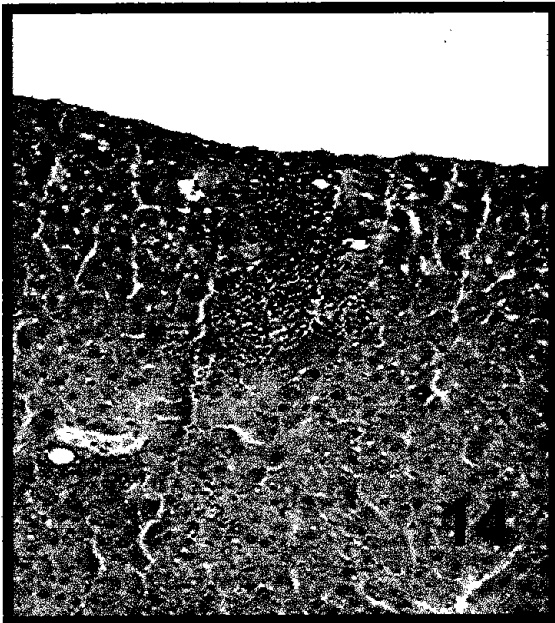
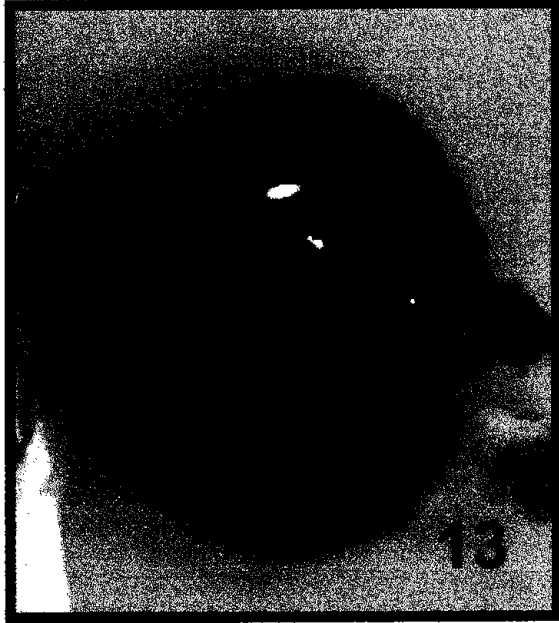


Figura 12. Corte de intestino control del tejido de la fotografía número 10, se observa la respuesta inflamatoria en un plano histológico más bajo, con presencia de parásitos (L) que no presentan marca, ni reacciones inespecíficas (PTI, 10X).

Figura 13. Hígado de jerbo sacrificado a los 50 d.p.i, con alteraciones consistentes en un puntilleo de reducidas dimensiones, difundido irregularmente en la superficie (PTI, 10X).

Figura 14. Lesión granulomatosa en la zona adyacente a la cápsula hepática, en la que se aprecia un predominio de macrófagos e infiltrado de polimorfonucleares discreto, con degeneración vacuolar adyacente y necrosis coagulativa, no se observa presencia de larvas (PTI, 10X).

Figura 15. Larva solitaria en el parénquima hepático situada aparentemente a la vanguardia de un infiltrado en el que predominan los mononucleares, el organismo presente presenta marcaje en el cuerpo y se percibe a su alrededor la presencia de marca difusa que corresponde a los TES de varias veces el diámetro del organismo (PTI, 10X).

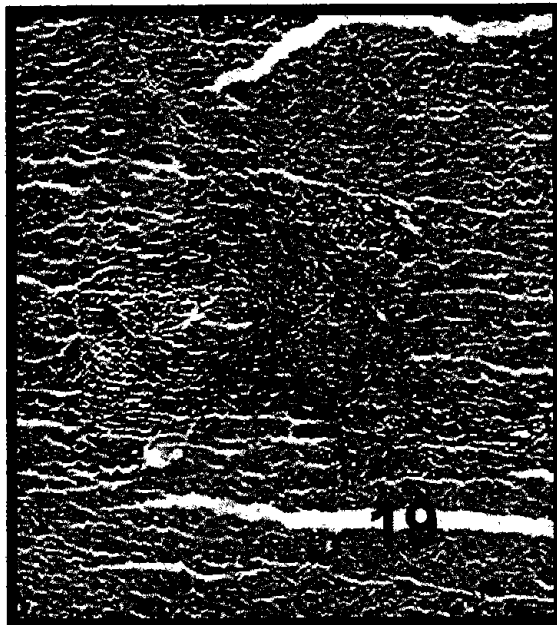
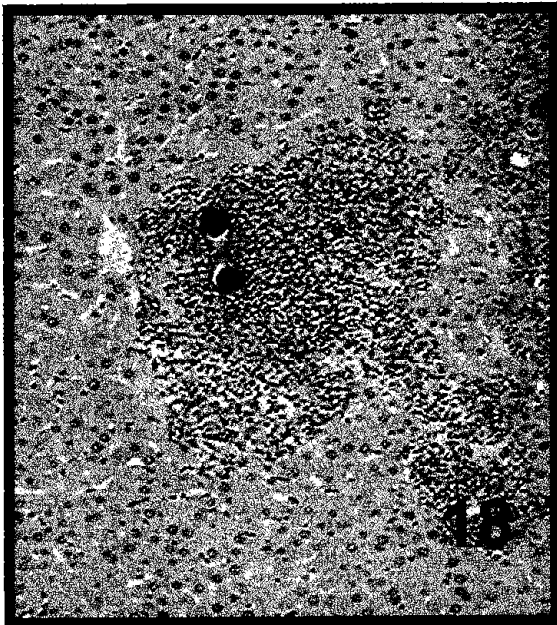
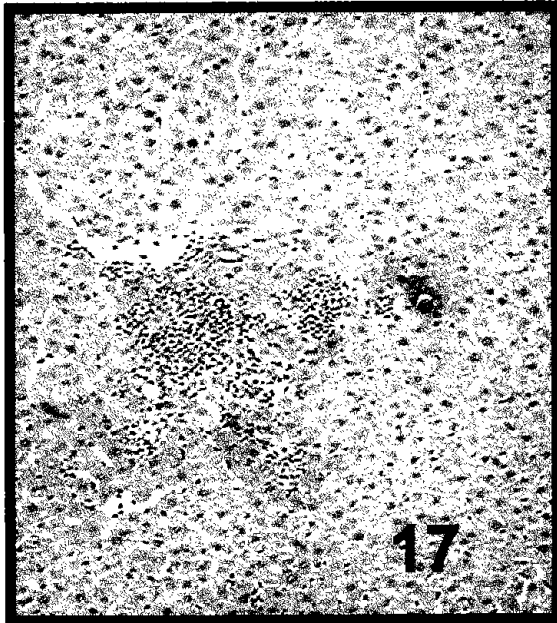
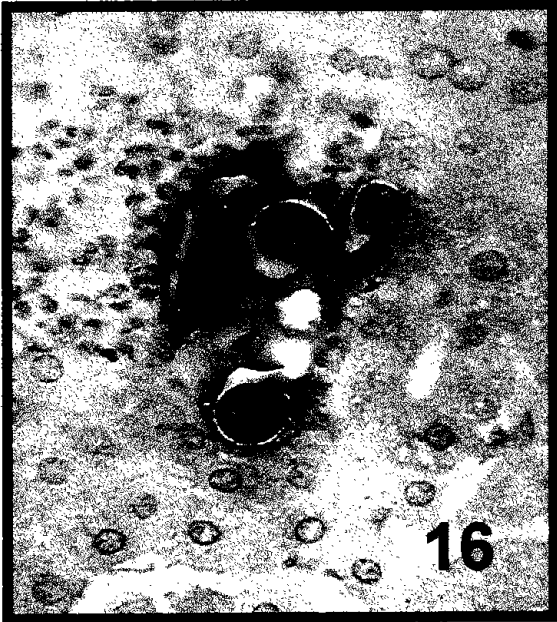


Figura 16. Vista amplificada del organismo observado en la fotografía 15, el grado de difusión de los TES en el tejido por el que se desplaza y la acumulación de células inflamatorias con una mezcla de monocitos y polimorfonucleares (relación 40: 60 %), los núcleos de los hepatocitos al lado derecho están aumentados de tamaño, en la parte baja presentan cromatina marginal, evidenciando el desarrollo de una necrosis coagulativa algunas de las células en particular las cercanas la marca de los TES en su interior, preparación de un animal sacrificado 2 d.p.i (PTI, 40X).

Figura 17. Hígado de un animal sacrificado a los 5 d.p.i., una respuesta inflamatoria a una larva en el margen del proceso. Con elevada concentración de polimorfonucleares y fondo de macrófagos, tejido normal a la izquierda y hacia abajo una zona de necrosis con pérdida de canales sinusoidales o desorganización de los mismos, con núcleos picnóticos más concentrados asociado a degeneración vacuolar, la larva con marca somática y difusión de TES que abarcan varias veces el diámetro del organismo en el tejido adyacente (PTI, 10X).

Figura 18. Infiltrado inflamatorio en el hígado de un animal sacrificado 15 d.p.i., estructurado como granuloma con predominio de macrófagos y reducida proporción de polimorfonucleares rodeando un corte transversal de la larva, presenta marca somática y no se percibe la difusión de TES al tejido periférico (PTI, 10X).

Figura 19. Hígado de un animal sacrificado a los 40 d.p.i, con granuloma estructurado en el que se mantienen pequeñas proporciones de macrófagos, con fibroblastos asociados al proceso de citatrización de la zona (HE, 10X).

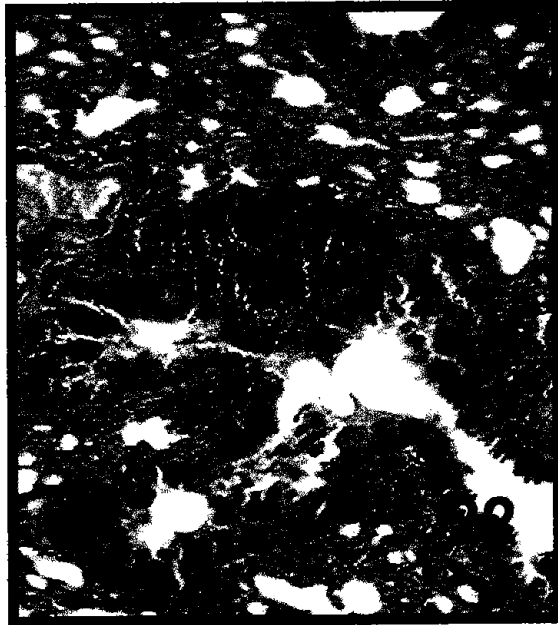
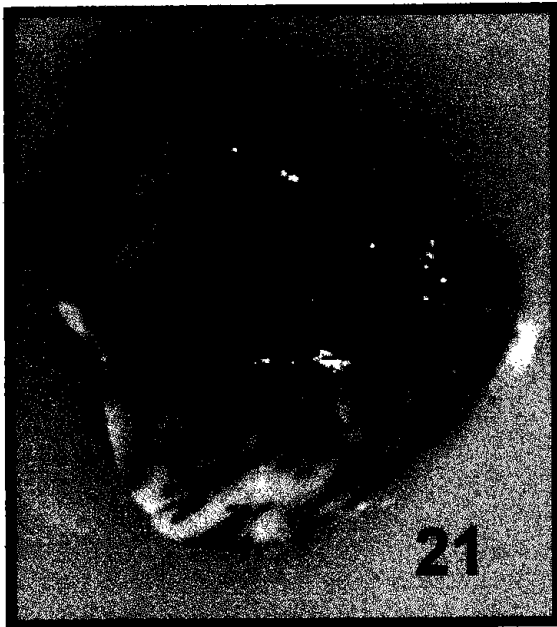
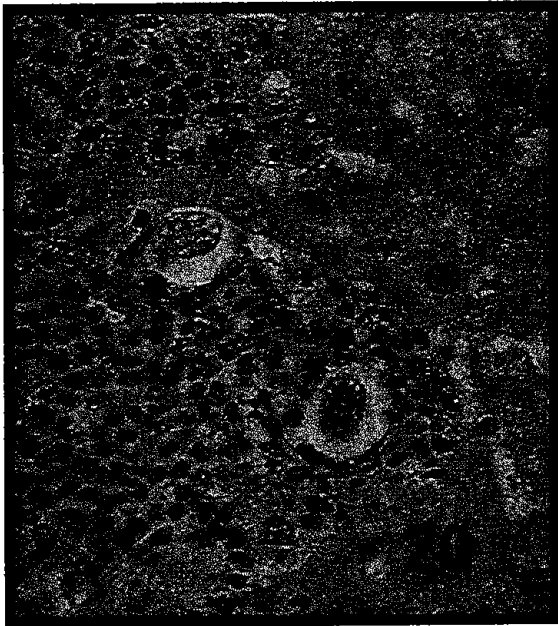


Figura 20. Vista a 40X de la misma larva de la fotografía número 17 de control en la que no se observa marca de somática ni de los TES (control PTI, 40X).

Figura 21. Pulmón de gerbo sacrificado 5 d.p.i., se observan hemorragias multifocales que van del tipo petequeial al equimótico en la superficie del pulmón, abarcando alrededor de un 50% del mismo.

Figura 22. Pulmón de jerbo sacrificado a los 5 d.p.i., la imagen de un bronquiolo necrótico, debajo de la membrana basal epitelial hay acúmulo de células mononucleares y polimorfonucleares, en el intersticio alveolar alrededor de este se ve la presencia de edema e infiltrado polimorfonuclear intersticial (HE, 10X).

Figura 23. Pulmón de un jerbo sacrificado a los 20 d.p.i., cuadro neumónico intersticial que en su periferia y área superior corresponde a los TES (PTI, 10X). reacción granulomatosa crónica, con pérdida total de alvéolos con una elevada composición de macrófagos, inmersas en el proceso dos larvas con una intensa marca somática, ambas presentan difusión de TES siendo más marcada en la situada en la porción inferior con pigmentación que se extiende a una distancia importante de su zona de asentamiento (PTI, 10X).

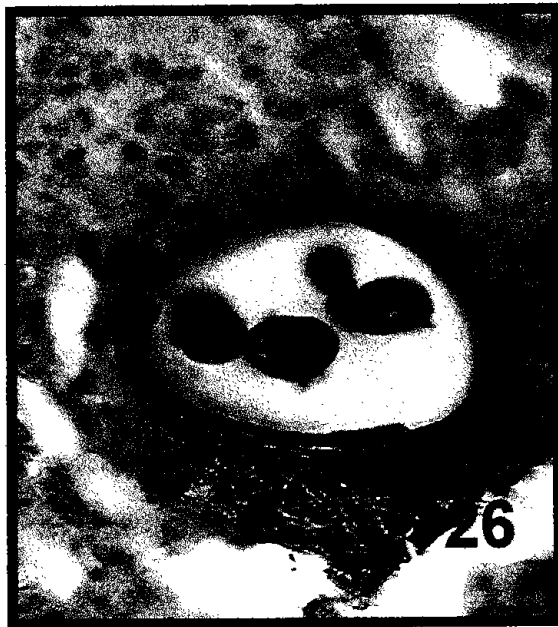
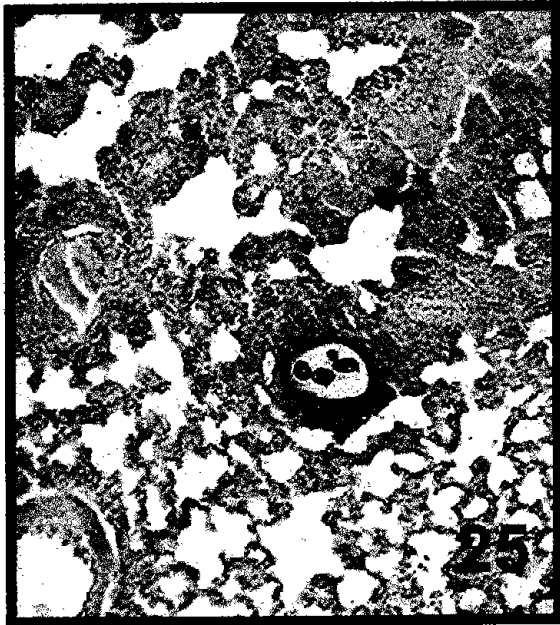


Figura 24. Pulmón de un jerbo sacrificado a los 25 d.p.i., con infiltrado de eosinófilos presente en las reacciones inflamatorias asociadas a las lesiones granulomatosas peribronquiales y perivasculares son bien perceptibles por el tipo de tinción utilizada (HE,100X).

Figura 25. Pulmón de jerbo sacrificado 20 d.p.i., con lesiones granulomatosas peribronquiales y perivasculares de tipo focal con desarrollo de fibrosis y áreas granulomatosas irregulares en la parte superior, la zona corresponde a una reacción inflamatoria intersticial con engrosamiento de septos, esta reacción es inducida por la presencia de un huevo de *Toxocara canis* integrado al parénquima, el cual presenta una intensa marca en la superficie del cascarón, en el cuerpo de la larva, la difusión de marca

Figura 26. Amplificación de la fotografía 23 en la que se encuadra específicamente el huevo larvado del helminto, que se encuentra inmerso en las masas de células inflamatorias, con intensa marca sobre el cuerpo de la larva, en las capas que componen el cascarón y la difusión del material antigénico hacia el tejido periférico, particularmente en la porción inferior (PTI, 40X).

Figura 27. Pulmón de un jerbo sacrificado el día 30 d.p.i., un cuadro neumónico intersticial, de una lesión granulomatosa crónica con pérdida total de alvéolos adyacente a la zona pleural, con una elevada composición de macrófagos, polimorfonucleares y sin presencia de larvas (4X).

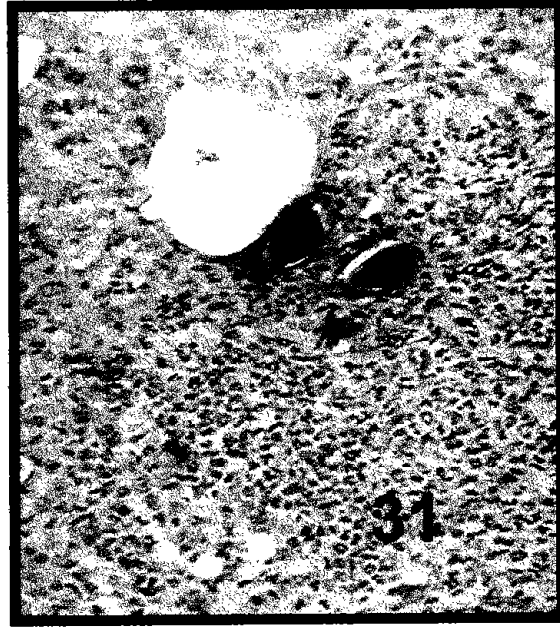
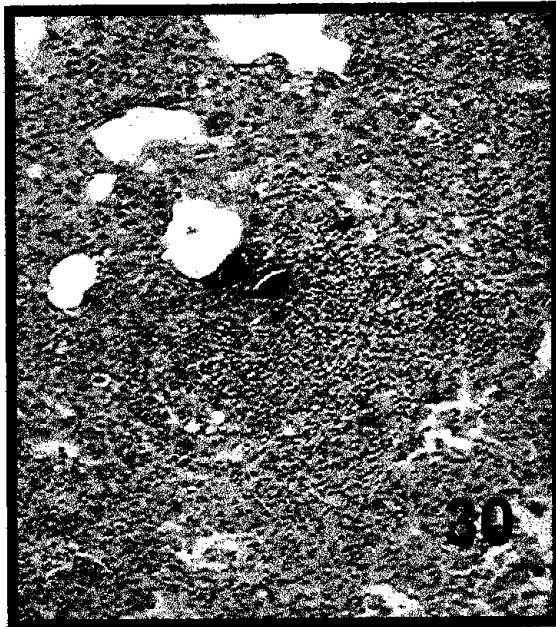
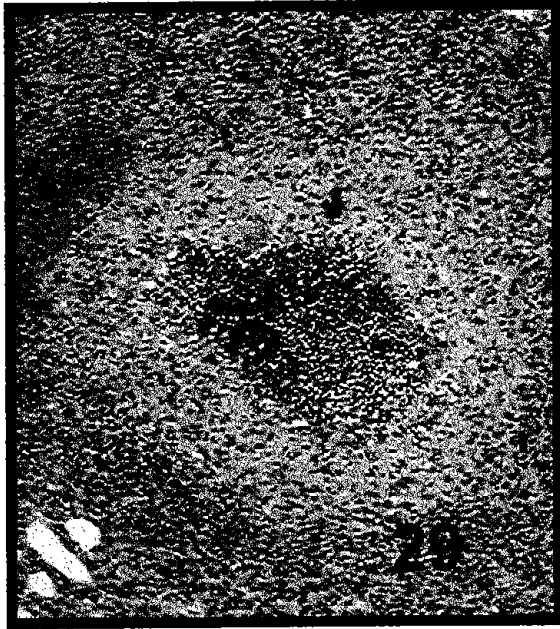


Figura 28. Tejido pulmonar de un jerbo sacrificado el día 40 d.p.i., en el cual se observa un foco granulomatoso peribronquial y perivascular característico del proceso crónico de la infección por *T. canis* (HE, 4X).

Figura 29. Tejido pulmonar de jerbo sacrificado el día 40 postinfección, una lesión crónica central caracterizada por un centro constituido por macrófagos, rodeado por una mezcla de fibroblastos en el exterior, una capa de células polimorfonucleares, la zona central corresponde al proceso crónico y hacia su periferia se inicia la respuesta aguda se asocia con la presencia de polimorfonucleares, en la periferia de la zona central se puede ver la presencia de una intensa marca de TES tanto libre como en el interior de las células presentes (PTI, 4X).

Figura 30. Tejido pulmonar de jerbo sacrificado el día 45 postinoculación un patrón de respuesta inflamatoria crónica igual a las descritas previamente, con la presencia de una larva marcada a nivel somático, presencia de TES difundido de la larva hacia el tejido periférico (PTI, 4X).

Figura 31. Amplificación de la lesión descrita en la fotografía número 29 (PTI, 10X).

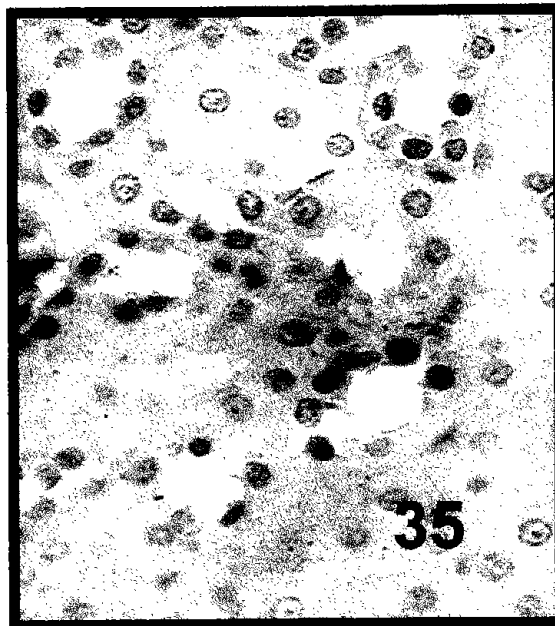
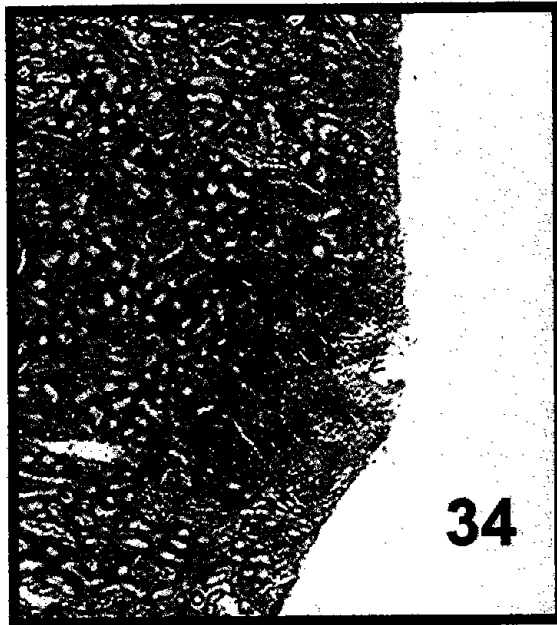
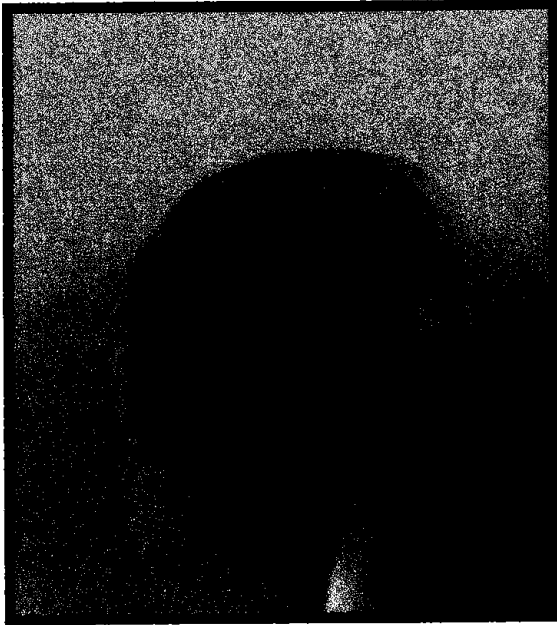


Figura 32. Riñón de un jerbo sacrificado 40 d.p.i. se observan focos granulomatosos de tamaño variable, con retracción del parénquima, lo cual indica la presencia de una nefritis cortical crónica con pérdida de la continuidad en la superficie.

Figura 33. Riñón de un jerbo sacrificado 5 d.p.i., en la parte superior hay un foco granulomatoso compuesto por células epitelioides, rodeado por abundantes células mononucleares que se expanden hacia el intersticio, disecando los túbulos renales y distribuyéndose hacia la superficie renal (HE, 10X).

Figura 34. Tejido renal de jerbo sacrificado a los 10 d.p.i., con zona necrótica periférica a una larva con rompimiento de cápsula, rodeada por un infiltrado de macrófagos y escasos polimorfonucleares, puede observarse una porción de larva que emerge de la superficie de la viscera en la zona de ruptura (HE, 4X).

Figura 35. Amplificación de la figura anterior en la que se ve con mayor detalle la larva de *Toxocara canis* emergiendo del área de la cápsula renal en la que se ha producido la ruptura (PTI, 40X).

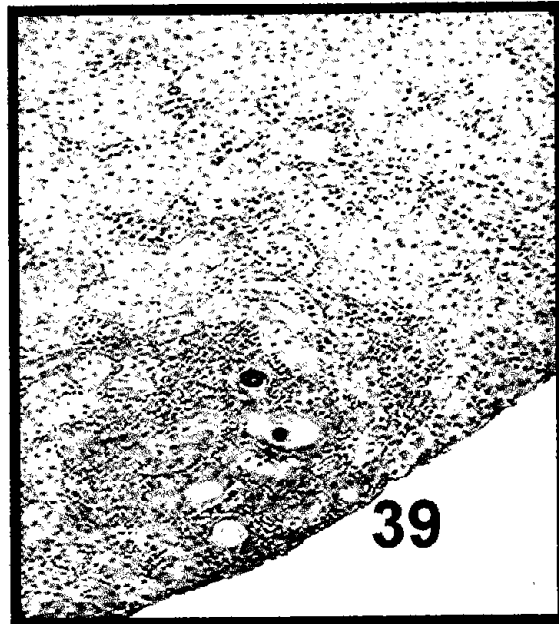
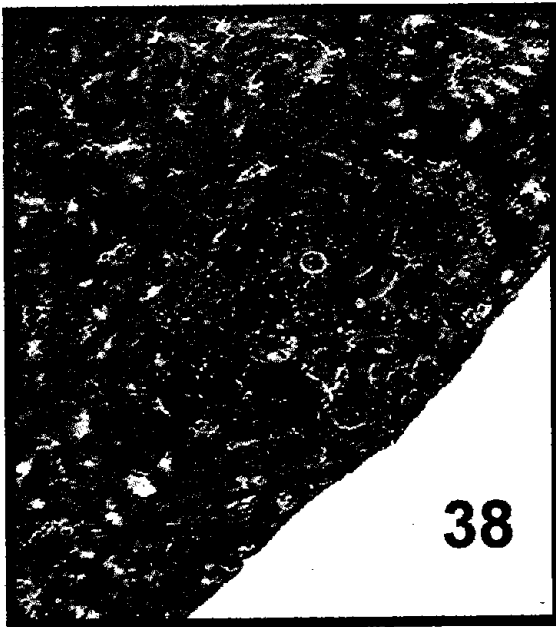
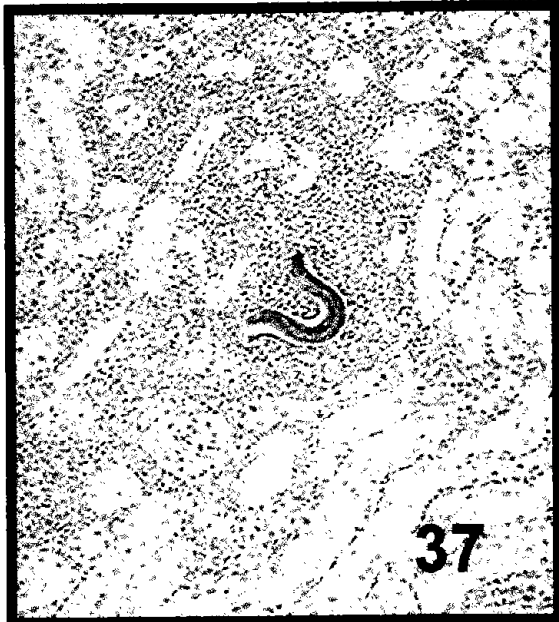


Figura 36. Tejido renal de la Figura 35 con las alteraciones previamente descritas en la que al someterse al proceso inmunohistoquímico puede observarse la presencia de TES marcados y difundidos en la zona de reacción inflamatoria por la que se desplazó el organismo, se observa una pequeña porción de este a nivel superficial por corresponder a un plano de corte más inferior que presenta marca intensa (PTI, 4X).

Figura 37. Tejido renal de un jерbo sacrificado a los 10 d.p.i., en esta porción de tejido hay reacción inflamatoria intersticial en torno a una larva en con predominio de mononucleares, la larva que aparece casi en su totalidad presenta una marca intensa a nivel somático y se observa la presencia de TES difundidos alrededor de todo el organismo integrándose al tejido periférico (PTI, 10X).

Figura 38. Tejido renal de un jерbo sacrificado a los 20 d.p.i., con un foco de inflamación granulomatosa rodeando los cortes transversales de la larva, con infiltrado de ubicación intersticial, caracterizado por un predominio de macrófagos y polimorfonucleares en menor proporción (4X).

Figura 39. Amplificación de la preparación anterior con procesamiento inmunohistoquímico, de una larva con marca somática y presencia de TES marcado y difundido en el proceso granulomatoso formado (PTI, 10X).

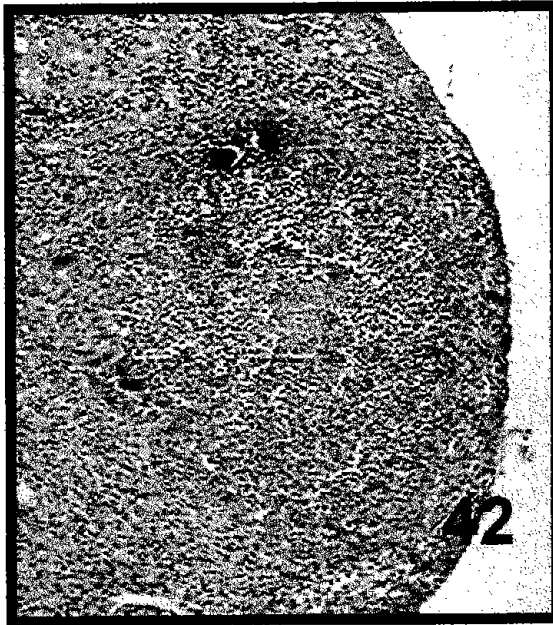


Figura 40. Tejido renal de un jerbo sacrificado 20 d.p.i. con larvas de *Toxocara canis*, bajo la cápsula que se han comenzado a desgarrar, comprimiendo la pared de un túbulo renal, con células en necrosis, sin presencia de reacción inflamatoria asociada, el organismo presenta marca somática al igual que las superficies con las que se encuentra haciendo contacto, al lado izquierdo una pequeña zona de difusión de TES (PTI, 20X).

Figura 41. Cápsula renal de jerbo sacrificado 55 d.p.i., con una reacción inflamatoria intersticial compuesta por células mononucleares (HE, 4X).

Figura 42. Riñón de jerbo sacrificado 40 d.p.i., respuesta granulomatosa con presencia de una larva marcada somáticamente en su periferia, hay presencia de TES marcado y diseminado en las cercanías de la zona de asentamiento de la larva (PTI, 10X).

Figura 43. Riñón de jerbo sacrificado 45 d.p.i., granuloma subcapsular compuesto por un centro de células epitelioides y rodeado por un infiltrado linfoplasmocítico, sin presencia de larvas (PTI, 4X).

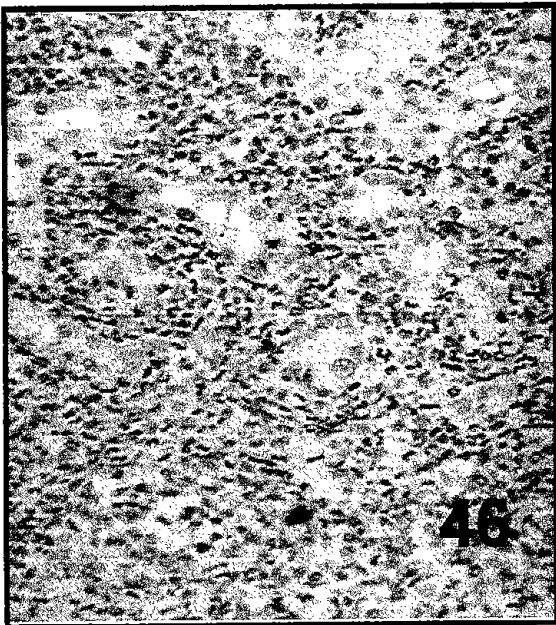


Figura 44. Riñón de jerbo sacrificado 55 d.p.i., un granuloma típico ubicado bajo la cápsula, sin presencia de larvas (HE, 4X).

Figura 45. Riñón de jerbo sacrificado a los 60 d.p.i., piogranuloma conteniendo una larva en el centro de la reacción, el organismo presenta marca somática y una ligera difusión de TES en la zona periférica (PTI, 10X).

Figura 46. Riñón de jerbo sacrificado a los 40 d.p.i. , ampliación de la lesión presentada en la figura 41, la muestra no fue tratada con el suero policlonal de conejo por lo tanto la larva presente no tiene marca somática, ni existen marcas de TES entre las células de la reacción inflamatoria presente (Control PTI, 40X).

Figura 47. Tejido muscular esquelético de jerbo sacrificado 30 d.p.i., con larva que ha ingresado recientemente a este tejido, no se observa una respuesta inflamatoria a su presencia, el cuerpo del organismo presenta una marca intensa y una ligera difusión de TES a la periferia de la zona de asentamiento (PTI, 40X).



Figura 48. Tejido muscular esquelético de un jerbo sacrificado 40 d.p.i., foco inflamatorio compuesto principalmente por macrófagos mezclados con polimorfonucleares, difundido en la reacción con presencia de TES marcados y dispersos en toda la zona sin evidencias de larvas en la misma (PTI, 20X).

Figura 49. Tejido muscular esquelético de un jerbo sacrificado 50 d.p.i., granuloma bien delimitado compuesto por células epitelioides y la presencia de una larva en la zona central de la lesión, el organismo presenta marcaje somático e infiltrado de TES en la zona periférica al área de asentamiento y en el eje longitudinal de la misma (PTI, 10X).

Figura 50. El mismo tejido muscular esquelético de jerbo sacrificado 50 d.p.i. a mayor aumento larva en la zona de reacción granulomatosa, la marca presente en el cuerpo que permite distinguir las estructuras internas del organismo, así como la cutícula de la porción anterior del mismo, de la que se desprendió su contenido y cobertura externa (epicutícula) por lo que se presenta un mínimo de marca que hace evidente su presencia ya que se han desprendido los TES de la superficie debido a la manipulación de que fue objeto, el nivel de magnificación permite observar los TES difundidos en la zona los cuales aparecen tanto dispersos entre las células, formando gránulos aparentemente por precipitación, como en el interior de algunas de las células (PTI, 20X).

Figura 51. Misma preparación sin incubación con el suero de conejo infectado, por lo que no existe el marcaje somático ni evidencia de difusión y depósito de TES en la zona periférica (Control PTI, 20X).

Figura 52. Cerebro de un jerbo sacrificado 10 d.p.i., una larva cortada en su longitud, integrada en un haz nervioso sin presencia de ninguna clase de respuesta inflamatoria en la zona, no son perceptibles las estructuras nerviosas por tener solo la contracción, el organismo muestra marca sobre su cuerpo y en su interior, se observan TES en su periferia, los cuales se muestran de mayor a menor concentración conforme se alejan del mismo (PTI, 10X).

Figura 53. Cerebro de un jerbo sacrificado 10 d.p.i., diferentes porciones del cuerpo de una larva cortados transversalmente, presentan una intensa marca somática tanto interior como superficial, presencia de TES abundantes también intensamente marcados cuya concentración se diluye del cuerpo hacia los tejidos periféricos formando una estela, la reacción observada en su contra consiste en la presencia de algunas células de la microglia alrededor del organismo (PTI, 20X).

Figura 54. Cerebro de un jerbo sacrificado 25 d.p.i., se observan dos porciones de una larva cortadas transversalmente rodeadas por escasas células de la microglia, el organismo muestra una intensa marca tanto en el interior del cuerpo, como en la superficie, además se observan TES intensamente marcados en la periferia del sitio de asentamiento (PTI, 40X).

Figura 55. Cerebro de un jerbo sacrificado 40 d.p.i., porciones del cuerpo de una larva con escasas células de microglía, con marca somática intensa (interna y superficial), es notable la gran cantidad y profundidad de TES difundidos en los tejidos periféricos a la zona de asentamiento (PTI, 40X).

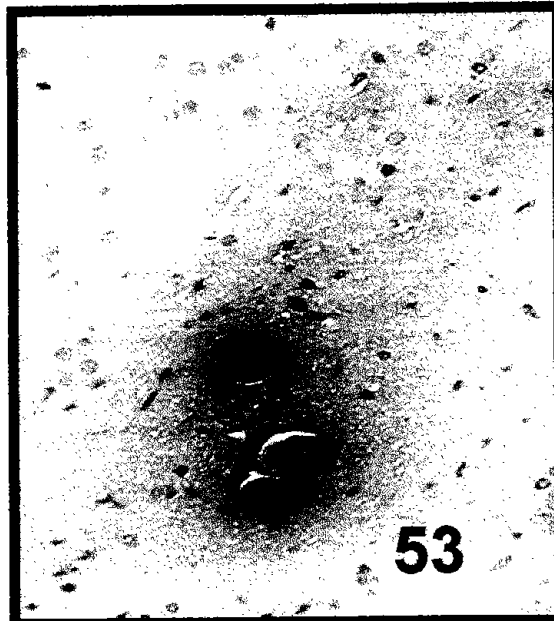
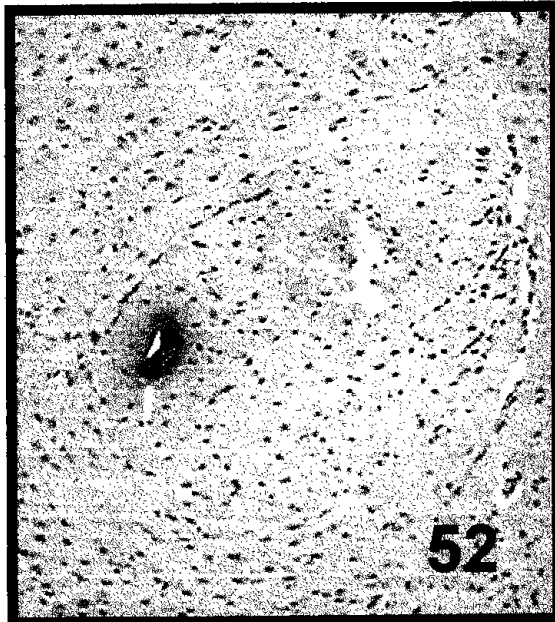
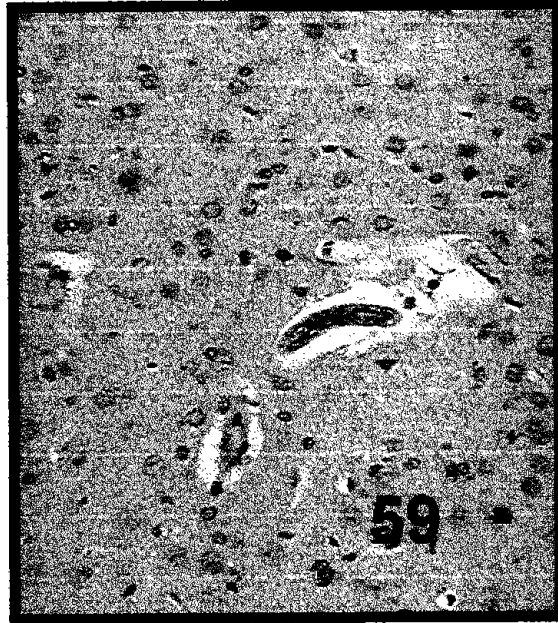
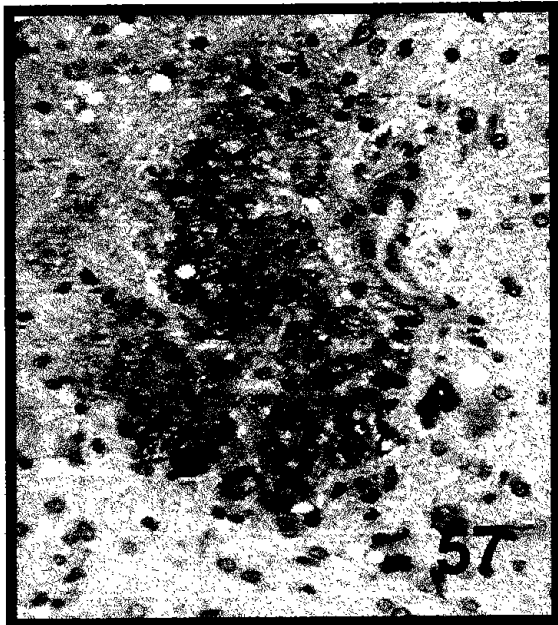


Figura 56. Cerebro de un jerbo sacrificado 20 d.p.i. dos fragmentos de una larva cortados transversalmente asociados a la presencia de infiltrado inflamatorio compuesto por macrófagos, linfocitos y algunos polimorfonucleares, el mismo patrón en cuanto los antígenos somáticos y TES, estos últimos marcados en el infiltrado presente (PTI, 20X).

Figura 57. Cerebro de un jerbo sacrificado 45 d.p.i., una gran concentración de TES integrada en una microgliosis, en la que el material esta presente intra y extracelularmente (PTI, 20X).

Figura 58. Cerebro de un jerbo sacrificado 45 d.p.i., porción del cuerpo de una larva situada en la periferia de un vaso sanguíneo que muestra distorsión de su pared, presenta un infiltrado perivascular compuesto por macrófagos y linfocitos, el patrón de marca es semejante al ya descrito, el aspecto que se resalta es que los TES se han infiltrado en la pared vascular y esta presente intra y extracelularmente, incluso en la luz (PTI, 40X).

Figura 59. Cerebro de un jerbo sacrificado 45 d.p.i., preparación control un fragmento de una larva del parásito carente de marca (Control PTI, 20X).



DISCUSION

Se ha determinado que cuando se mantienen las larvas de *Toxocara canis* en medios para cultivo celular libre de suero, producen una gran cantidad de proteínas que pueden ser reconocidas por el sistema inmune de diferentes hospedadores. En este contexto se ha propuesto que estas proteínas son liberadas *in vivo* en animales infectados y este proceso se relaciona con la evasión de la respuesta inmune y la evolución de la enfermedad.

En este trabajo se buscaba establecer una correlación entre los cambios morfológicos macro y microscópicos, con la presencia de los TES asociados a parásitos o su difusión demostrada por la reacción inmunohistoquímica.

La estandarización del ensayo inmunohistoquímico, fue una herramienta que permitió evidenciar los antígenos en el cuerpo de las larvas, así como los TES difundidos en los tejidos, la clave para lograrlo en primer término fue el suero de conejo infectado con larvas de *T. canis*, que presentaba elevadas concentraciones comprobadas de anticuerpos específicos, y reconocía los más importantes, lo que llevó a un marcaje preciso que permitía demostrar organismos y productos específicos de estos que son los de bajo peso molecular desde los primeros días (Havasiova-Reiterova et al.1995; Alba, 1999; Helwigh et al., 1999). El hecho de que este tipo de producto pueda obtenerse fácilmente, con buen desempeño y en corto plazo es una ventaja y si se mantienen los animales infectados estos

son una fuente constante del producto. Otros elementos dignos de ser mencionados como relevantes para el desarrollo de la técnica son los bloqueadores de reacciones inespecíficas, que son claves para el éxito o fracaso de su desarrollo ya que debe establecerse cuales son los más adecuados para lograr un adecuado desarrollo de la reacción.

Fue notable el marcaje sobre y dentro del cuerpo de las larvas (marcaje de intestinos, glándulas accesorias, cutícula etc.), con una intensa reacción siempre. Además en muchos casos las larvas se presentaban inmersas entre los componentes de la respuesta inflamatoria y con halos de TES marcados y difundidos a diferente profundidad en los tejidos. También se observó marcaje en el margen de las zonas de asentamiento, a veces los depósitos formaban estelas en lo que correspondería a los puntos de desplazamiento del parásito por el tejido. Además los TES fueron observados libres en algunos tejidos que no mostraban la presencia de secciones de larvas formando un halo oscuro y a veces formando gránulos en los que se concentraba el material, el hallazgo de este tipo de reacción, muestra que la hipótesis planteada en este trabajo en la que se considera, que además de la interacción física con el parásito los TES se asocian a la inducción y mantenimiento de la respuesta inflamatoria cuando estos son liberados, al observarse el marcaje de los antígenos en las zonas lesionadas,, con reacciones inflamatorias tempranas (agudas) en los tejidos de los animales que fueron evaluados durante los primeros d.p.i., y su persistencia (cronicidad de las lesiones) en los tejidos, con variaciones en la composición de las células asociadas a la respuesta inflamatoria, que se relacionan

con la evasión del parásito a los mecanismos de defensa del hospedero, las larvas observadas en los cortes de tejido se observaban intactas, por lo que, la dinámica de liberación gradual de productos al interactuar con anticuerpos o células del hospedero, funciona como elemento de distracción que les permite sobrevivir por largo tiempo, aún cuando el organismo haya sido capaz de generar una respuesta inmune completa, incluso en el caso de sitios con alta densidad de TES dentro de focos inflamatorios crónicos podría considerarse un indicador de que la presencia de éstos, está asociada a la persistencia de las lesiones en los diferentes órganos como componente importante en el desarrollo de la enfermedad causada por este nematodo.

El patrón migratorio de las larvas observado en este trabajo coincide con los datos de trabajos preliminares desarrollados con esta especie y con otros tipos de animales (Schacher, 1957; Alba, 1999; Buendía, 2000; Aldawek et al., 2002).

A nivel macro y microscópico las alteraciones desencadenadas como consecuencia de la infección, correspondieron con la producción de hemorragias y el desarrollo de procesos inflamatorios con presencia de eosinófilos en casi todos los tejidos con la excepción del cerebro, en el que no se observó primariamente la respuesta inflamatoria, siguiendo un comportamiento semejante al observado por otros autores en diferentes especies animales (Alba, 1999; Buendía, 2000; Aldawek et al., 2002,).

Como se describió en la metodología, en todas las preparaciones procesadas en la técnica inmunohistoquímica se usó como contratinción hematoxilina solamente y no eosina por lo que los eosinófilos no se tiñeron y por esa

razón en las preparaciones se observan como polimorfonucleares.

En el intestino, fueron perceptibles lesiones macroscópicas de tipo hemorrágico desde los 2 d.p.i. en la porción final del intestino delgado y en el ciego (figura 8), evidenciándose larvas durante los primeros días, coincidiendo con el desarrollo de reacciones inflamatorias agudas (figura 9) que, en las muestras de períodos posteriores tendieron a la involución. Dentro de los primeros días, se observó la difusión moderada de TES en las lesiones, tanto a nivel de las vellosidades, como en la pared del intestino (figuras 10 y 11) concordando con trabajos similares desarrollados en jerbos y ovinos (Alba, 2000; Aldahuek et al., 2002).

En el caso del hígado se observaron lesiones macroscópicas muy discretas (figura 13) sólo dentro de los primeros días, en tanto que a nivel microscópico en casi todas las piezas y a casi todos los niveles (parénquima, cápsula) (figuras 14 y 19), se observaron alteraciones microscópicas inflamatorias formando trayectos durante los primeros días de análisis, asociados a la migración del parásito y, posteriormente a la organización de reacciones granulomatosas en la mayoría de los casos sin la presencia de larvas (Parson et al., 1990; Alba, 1999), que mostraban depósitos de TES marcados en su composición e infiltrado eosinofílico. Las larvas en migración hepática fueron observadas hasta el día 15 p.i., a partir de esta etapa esta víscera queda excluida de la ruta migratoria para un elevado porcentaje de larvas (figuras 15, 16 y 17), sin embargo las lesiones persisten.

Los pulmones estuvieron entre los órganos más afectados (figura 21) durante la migración de larvas en

ellos, así como después de haberse desplazado, se dio el desarrollo de una destrucción gradual (coincidente con su desplazamiento) de los tejidos, caracterizada por la aparición de lesiones hemorrágicas que alcanzaron su máximo entre el día 5 y 10, que microscópicamente correspondían con una severa respuesta inflamatoria, con alta densidad de eosinófilos y grave afección del parénquima. Posteriormente se produjo la involución gradual, dando paso a la reparación, pero no a la regeneración, evidenciada microscópicamente con el depósito de material cicatrizal bajo la cápsula, (figuras 22, 24 y 27), esto fue perceptible tanto macroscópica como microscópicamente en la superficie de la víscera y en el parénquima, dejando lesiones muy extensas alrededor de los bronquiolos y vasos sanguíneos (Tominura, et al., 1976, Alba, 1999). En esas lesiones se observó la persistencia de los TES, larvas y TES se pudieron detectar hasta los 45 d.p.i., su persistencia en un período tan avanzado se explica en función a un proceso identificado que se relaciona con la recirculación de los organismos hacia sitios de asentamiento definitivo. Los organismos observados presentaban un marcaje intenso a nivel somático, así como la difusión de TES en su periferia correlacionando con la intensidad de las lesiones (figuras 23, 30 y 31), también se observó la presencia de TES libres formando gránulos en lesiones inflamatorias crónicas sin presencia en las preparaciones de larvas (figura 29).

Se detectaron zonas con lesiones granulomatosas densas en eosinófilos y muy severas en parénquima pulmonar asociadas a presencia de huevos (figuras 25 y 26) larvados aspirados por los animales, que estaban rodeados por la reacción, en algunos casos un aspecto de desgarramiento del

tejido y la difusión de TES que se desplazaba del huevo hacía el tejido inflamatorio lo cual implica activa interacción parásito-hospedero que puede causar trastornos también.

En riñón hubo lesiones macroscópicas desde el día 5 y se observaron en todos los animales en el resto de los grupos, a nivel microscópico se observó las reacciones inflamatorias tempranas y crónicas, en algunos casos con presencia de las larvas intensamente marcadas, TES difundido en la zona inflamada o estos productos libres formando gránulos, incluso en tejidos en los que no se observaban larvas en la porción cortada, (figuras 35, 36, 37, 38), las lesiones al principio, predominaban en la zona medular (figura 37) y en menor proporción en la cápsula, con el patrón inflamatorio ya descrito y gradualmente con el paso del tiempo sólo se veían lesiones inflamatorias crónicas en la cápsula (figuras 38, 39 , 43 y 44), Figura 40, en un caso se observó una amplia zona subcapsular con gran cantidad de TES difundido y marcado, la cápsula estaba rota y la larva libre a punto de separarse del tejido, lo cual permitiría su paso a la cavidad, (figuras 34 y 36), este hallazgo es sugestivo de que la recirculación de las larvas no ocurre por vía sanguínea, sino a través de la cavidad, ya que la densidad de lesiones capsulares fue muy elevada y persistente, además en la mayoría de los casos no se observaron larvas presentes en su interior.

La frecuencia y densidad de lesiones y larvas observadas en este órgano, son un indicador de su papel como tejido de retorno en los desplazamientos al azar, para llegar a los tejidos de asentamiento definitivo del parásito y esta interacción física, aunada a la liberación

y depósito de los TES contribuye de forma importante al deterioro de los tejidos.

En cerebro no se observaron lesiones macroscópicas en ninguno de los animales, microscópicamente se observaron larvas a partir del día 10 sin respuesta inflamatoria importante en la mayoría de las piezas revisadas (figuras 52 y 54), la respuesta consistió en la acumulación en pequeñas cantidades de células de la microglía que son los fagocitos locales, en algunos casos, contenían los TES en su interior, solo en un caso se observó la presencia de una respuesta inflamatoria integrada de baja intensidad respecto a las observadas en otros tejidos (figuras 56 y 57), ese tipo de reacciones en cerebro se han descrito en infecciones muy crónicas (Parson et al., 1990). Este órgano fue el más densamente parasitado, las larvas detectadas, presentaban marca somática y también los TES presentes en su periferia, se observaron depósitos de este material en tejidos que no presentaban larvas (figura 57) y aún entre las células inflamatorias que llegaban a observarse, en este tejido, se observó que los TES presentaban mayor difusión por el nivel de marcaje de TES observado y en contraposición la respuesta inflamatoria fue la menos eficiente (figuras 53, 54 y 55). Esa notable diferencia entre la respuesta inflamatoria de cerebro y los otros tejidos, puede asociarse con su estructura, ya que los tejidos capaces de sintetizar colágena y elastina tienen gran potencial de respuesta inicial, la mantienen, haciéndola crónica y eficiente, establecen procesos de reparación e incluso de regeneración. Esta capacidad se debe a su estructura, ya que sus endotelios y capa basal tienen una estructura y disposición tal, que permite un fácil acceso a las células inflamatorias, para participar

en estos eventos. El tejido cerebral en tanto, cuenta con un sistema local de respuesta primaria y única que son las células de la microglía que corresponden a monocitos extravasados insertados en proyecciones extravasculares de esta especial capa basal, que constituye la barrera hematoencefálica, y una vez que se presenta una alteración se activan, desplazándose hacia esa zona ocurriendo cambios de estructura y su multiplicación para contrarrestar la agresión, sólo en caso de que resulte muy severa y persistente se da acceso a células inflamatorias típicas lo cual ocurre a largo plazo.

En tejidos distintos al cerebro, las infecciones se resuelven con facilidad con la respuesta inflamatoria y después, muchos de ellos son regenerados, restaurando en un alto porcentaje estructura y funciones, restituyendo primero tejido de sostén y después los componentes celulares propios. En tanto, el tejido cerebral, por su estructura tiene limitadas posibilidades de desencadenar reacciones intensas contra los organismos, ya que su sola presencia tiene efectos más nocivos que benéficos por la densidad de células existente, la respuesta inflamatoria causa destrucción tisular, y por la ausencia de componentes de soporte como colágena y elastina el deterioro es muy severo, y muy bajo el potencial de regeneración.

A nivel de músculo esquelético no se observaron alteraciones macroscópicas asociadas a la presencia de parásitos, se observaron larvas desde el día 30. También se observaron larvas recién ingresadas al tejido que no generan reacción inflamatoria (figura 47), y esta gradualmente se organiza, para estructurar un granuloma típico, siguiendo un patrón semejante al identificado en

estudios previos (Alba, 1999; Abunnabi et al., 2000) (figuras 48, 49 y 50). En la estructuración de esa lesión, los TES parecen desempeñar un papel importante, ya que se encontró que en las zonas de respuesta inflamatoria había una gran infiltración de TES con células, lo cual sugiere, que estos compuestos son inductores de inflamación e inmunoevasión, que aquí es vital por la diferencia estructural respecto al cerebro, y constituye un factor que les permite a las larvas mantenerse estáticas y viables por largo tiempo en los tejidos del hospedero.

La producción y liberación de TES por las larvas a nivel general tiene dos efectos importantes, el primero asociado a secuelas inflamatorias y cicatrizales en pulmón y riñón, que ya sin larvas se mantienen por largo plazo y, segundo la persistencia de los organismos en cerebro y músculo esquelético, con el mantenimiento de procesos inflamatorios con efectos a largo plazo.

No se detectó la presencia de organismos en ojo, lo al parecer se asoció a la cantidad de larvas inoculadas, ya que existe una relación proporcional entre larvas inoculadas y las implantadas en este tejido. No se observaron alteraciones microscópicas que sugirieran la presencia de las larvas (Fenoy et al., 2001).

La dosis de larvas inoculada se reflejó en que en algunos tejidos la cantidad de estados larvarios fue reducida, al igual que el grado de deterioro tisular, el jerbo, es un animal especialmente susceptible a dosis elevadas de larvas que producen fácilmente mortalidad en los animales, se pretendía inducir una infección que se mantuviera por un lapso relativamente largo y poder determinar el comportamiento de las larvas y los productos que liberan en los tejidos.

CONCLUSIONES.

- Se logró estandarizar una prueba inmunohistoquímica para detectar la presencia de los TES de *Toxocara canis*.
- Se detectó la presencia de los TES en el cuerpo de las larvas de *Toxocara canis*, así como en todos los tejidos en los que se buscaron.
- Se observó que los TES desprendidos del cuerpo de las larvas se difunden en los tejidos de asentamiento y en las zonas de desplazamiento formando agregados o bien son interiorizados al citoplasma de las células que los fagocitan, particularmente en cerebro y riñón.
- La mayoría de los tejidos estudiados presentaban una respuesta inflamatoria persistente aún cuando no presentaban larvas presentes, pero sí marcaje de TES, lo cual es un indicador de su papel en esta respuesta, siendo los órganos más dañados microscópicamente los pulmones y riñones.
- La presencia de larvas y lesiones persistentes en los tejidos del hospedero tiene un impacto importante para la salud y condición de vida de los hospederos infectados.

REFERENCIAS.

- Abdunnabi, A.R., Vandack, N., Serufo, J.C., Tixeira, M.D., Brasileiro, F.G., Antunes, M.C., Lambertucci, J.R., (2000). Tropical pyomiositis and human toxocariasis: a clinical and experimental study. *Exc. Med.*, 109, 422-425.
- Aguila de la Puente, C., Cuéllar D, C., Guillén Ll., J.L., (1988). Anticuerpos monoclonales frente al antígeno excretor-secretor de *Toxocara canis*. *Rev.Ib.Parasitol.*, 48(2), 209-220.
- Asao, N., Chu, A.E., Tsukidate, S., Fujita, K., (1997). A rapid and sensitive screening kit for the detection of anti-*Toxocara* larval ES antibodies. *Paras.Int.*, 108, 184-195.
- Alba H.F., Evaluación de un modelo de Toxocariasis ocular y sistémica empleando jerbos (*Meriones unguiculatus*), Tesis doctoral, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, 1999.
- Aldawek, A.M., Levkut, M., Revajova, V., Kolodzieyski, L. Seveikova, Z., Dubinsky, P., (2002). Larval toxocariosis in sheep: the immunohistochemical characterizations of lesions in some affected organs. *Vet. Paras.* 105, (207-214).
- Bardon, R., Guillén, J.L., Aguila, C., (1995). Idiotypic replica of a *Toxocara canis*, excretory-secretory antigen epitope. *Int. J. Paras.* 25(1), 105-111.
- Bardon, R., Cuéllar, C., Guillén, J.L., (1994). Evaluation by larval recovery of mebendazole activity in experimental murine toxocariasis. *J. Paras.*, 108, 587-592.
- Badley, J.E., Grieve, R.B., Bowman, D.D., Glickman L.T., (1987). Analysis of *Toxocara canis* larval excretory-secretory antigens: physicochemical characterization and antibody recognition. *J. Paras.*, 73(3), 593-600.
- Badley, J.E., Grieve, R.B., Rockey J.H., Glickman, L.T., (1987). Immunomediated adherence of eosinophils to *Toxocara canis* infective larvae: the role of secretory-excretory antigens. *Paras.Imm.*, 9, 133-143.
- Beesley E.J., *Immunocytochemistry, A practical Approach*, Oxford University Press, 1993.
- Beaver, P.C., Snyder, C.H., Carrera, G.M., Dent, J.H., Lafferty, J.W., (1951). Chronically eosinophilia due to visceral larva migrans. 65, 7-18.
- Bernardino, C.R., Rubin, P.A.D., (2001). Recurrent orbital retinoblastoma after enucleation. *J. Paras.*, 1988, 16, 164-169.
- Bishop, B.F., Bruce, C.I., Evans, N.A., Goudie, A.C., Gration, K.A.F., Gibson, S.P., Pacey, M.S., Perry, D.A., Walshe, N.D.A., Witty, M.J., (2000). Selamectin: a novel broad-spectrum endectocide for dogs and cats. *Vet. Paras.* 89, 163-176.

Bowman D.D., Mika Grieve M., Grieve R., (1987). Circulating excretory-secretory antigen levels and specific antibody responses in mice infected with *Toxocara canis*. *Am.J.Trop.Med.Hig.* 36(1): 75-82.

Bowman, D.D., Griffiths J. K., (2000). Larval Toxocariasis. *Curr. Treta. Opt. Inf. Dis.*, 2: 70-77.

Buendía J. J.A., Evaluación de las lesiones histopatológicas producidas por larvas de *Toxocara canis*, en jerbos (*Meriones unguiculatus*) después del tratamiento con moxidectina, Tesis profesional, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, 2000.

Chia-Kwung, F., Yun-Ho, L., Wen-Yuan, D., Kua-Eire, S., Biers, B., Kimura, J., (2003). Uveitis after death of a larva in the vitreous cavity. *Am. J. Ophtal.*, 77(1), 66-69.

Ciarmela, M.L., Minvielle, M.C., Lori, G., Basualdo, (2002). Biological interaction between soil fungi and *Toxocara canis* eggs. *Vet.Paras.*, 103, 251-257.

Criado, F.A., Gutiérrez, G.L., Rodríguez, Caabeiro, F., Reus, G.E., Roldan, S.M.A., Díaz, S.M.A., (2000). A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain. *Vet. Paras.*, 92, 245-251.

Cuéllar, C., Fenoy, S., De Aguila, C., Guillén, J.L., (1993), Cross reactions of sera from *Toxascaris leonina* and *Ascaris suum* infected mice with *Toxocara canis*. *Int. J. Paras.*, 25(6), 731-739.

Cuéllar, C., Fenoy, S., De Aguila, C., Guillén, J.L., (2001), Isotipe specific immune responses in murine experimental toxocariasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 96(4), 549-553.

De Negri C., (1999). Atlas de Parasitología, <http://www.cdfound.to.it/default.htm>

De Savigny, D.H., (1975). In Vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara canis* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *J.Paras.*, 61(4), 781-782.

Del Aguila, C., Cuéllar, C., Guillén, J.L., (1998). Excretory-secretory antigen of *Toxocara canis*: recognition profiles of polyclonal and larvicidal monoclonal antibodies. *Paras. Imm.*, 10, 237-241.

Epe, C., Meuwissen, M., Store, M., Schnieder, T., (1999). Transmission trials, ITS2-PCR and PAPD-PCR show identity of *Toxocara canis*, isolates from red fox and dog. *Vet.Paras.*, 84 (1-2), 101-102.

Espinoza, E., Pérez-Arellano, J.L., Vicente, B., Muro, A. (2002). Cytoplasmic signalling pathways in alveolar macrophages involved in the production of nitric oxide after stimulation with excretory-secretory antigens of *Toxocara canis*, *Paras. Imm.*, 24, 535-544.

- Fan, Ch., Lin, Y., Du, W., Su, K., (2002). Infectivity and pathogenicity of 14 month cultured embryonated eggs of *Toxocara canis* in mice. *Vet. Paras.*, 113, 145-155.
- Fenoy, R.S., Cuéllar del Hoyo, C., Aguila, P., Guillén, J.L., (1989). Posibles reacciones cruzadas del antígeno excretor-secretor de *Toxocara canis* en ELISA con antígenos de otros ascáridos y proteína C-reactiva. *Rev. Ib. Paras.* 49(2), 185-192.
- Fenoy, R.S., Cuéllar del Hoyo, C., Aguila, P., Guillén, J.L., (1992). Persistence of immune response in human toxocariasis as measured by ELISA. *J. Paras.*, 7, 1037-1038.
- Fenoy, S., Ollero, M.D., Guillén, J.L., Del Aguila, C., (2001). Animal Models in ocular toxocariasis. *J. Helminthol.*, 75, 119-124.
- Finkelman, F.D., Gause, W.C., Urban, J.F., (1995). Cytokine control of protective immunity nematode infections. *Mol. Paras.*, 65, 467-476.
- Fisher, M., (2003). *Toxocara cati*: an underestimated zoonotic agent. *Trends in Paras.*, 19(4) 167-169.
- Fox, E., Kassai, T., (1998). *Toxocara canis* infection in the paratenic host: a study on the chemosusceptibility of the somatic larvae in mice. *Vet. Paras.*, 73, 244-259.
- Garrido F., G., (2000). Metodologías Generales y Avances en Microtécnica Aplicadas a las Ciencias Biológicas, Notas del curso, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
- Gems, D., Maizels, R.M., (1996). Abundantly expressed mucin-like protein from *Toxocara canis* infective larvae: The precursor of larval surface coat glycoproteins. *Med. Sc.*, 93, 1665-1670.
- Glickman, L., Cypess, R., Hiles, D., Gessner, T., (1979). *Toxocara*-specific antibody in the serum and aqueous humor of patients with presumed ocular and visceral toxocariasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28(1), 29-35.
- Gordon, W., Green, J.A., Frothingham, T.E., Sturmer, R.A., Walls, K.W., Patalnis, V.A., Ellis, G., S., (1984). *Toxocara canis* infection: Clinical and epidemiological associations with seropositivity in kindergarten children. *J. Infect. Dis.*, 149(4), 591-596.
- Greve, J.H., (1971). Age resistance to *Toxocara canis* in Astrid free dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 32(8), 1185-1191.
- Jones, e.R., Finkelman, D.F., Hester, B.R., Kayes, G.S., (1994). *Toxocara canis*. Failure to find receptors (FcεR) on eosinophils from infected mice suggest that murine eosinophils, do not kill helminth larvae by an IgE dependent mechanism. *Exp. Paras.*, 78, 64-75.
- Habluetzel, A., Traldi, G., Ruggieri, S., Attili, A.R., Scuppa, P., Marchetti, R., Menghini, G., Esposito, F. (2003). An estimation of *Toxocara canis* prevalence in dogs, environmental egg contamination and risk of human infection in the Marche region of Italy. *Vet. Paras.*, 113, 243-252.

Helwich, A., B., Lind, P., Nanses, P., (1999). Visceral larva migrans: migratory pattern of *Toxocara canis* in pigs. *Int. J. Paras.*, 29, 559-565.

Hiratochi, M., Takamoto, M., Tatemichi, S., Sugane, K., (2000). Inhibition of interleukin 5 with no influence on interleukin 4 production by an allergic drug, tranilast, in *Toxocara canis*. Infected mice. *Int. J. Inmunopar.*, 22(6), 463-471.

Hofkin, B.V., (2001). American Society of Parasitologists presents parasites on Rio Grande. *Trends in Paras.*, 17(11), 511-512.

Hurley, P., D., Aguilar, M.,A., Garibay B., J., R., Landeros V.,J.(1980). *Estadística, CINVESTAV, Primera Edición.*

Iglesias, R., Leiro, J., Ubeira, F.M., Santamarina, M.T., Navarrete, I., Sanmartin, M.L., (1996). Antigenic cross-reactivity in mice between third-stage larvae of *Anisakis simplex* and other nematodes. *Parasitol. Res.*, 82, 378-381.

Kayes, S.G., Adams, O.J., (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), 573-579.

Kramer, F., Vollrath, T., Schnieder, T., Epe, C., (2002). Improved detection of endoparasite DNA in the soil sample PCR by the use of anti-inhibitory substances. *Vet. Paras.*, 108, 217-226.

Kuroda, E., Yoshida, Y., Shan, B.E., Yamashita, U., (2001). Supresión of macrophage interleukin-12 and tumour necrosis factor-alfa production in mice infected with *Toxocara canis*. *Paras. Imm.*, 23, 305-311.

Kusama, Y., Takamoto, M., Kasahara, T., Takatsu, K., Nariuchi, H., Sugane, K., (1995)., Mechanisms of eosinophilia in BALB/c-un/+ and congenitally athymic BALB/c-un/un infected with *Toxocara canis*

Lee, K., Suh, Ch., (1976). Transplacental migration of *Toxocara canis* larvae in experimentally infected mice. *J. Paras.*, 62(3), 460-465.

Lynch, R.N., Hagel, I., Vargas, V., Rotundo, A., Varela, C., A., Di Pisco, C., M., Hodgen, A. N., (1993), Comparable seropositivity for ascariasis and toxocariasis in tropical slum children. *Paras. Res.*, 63, 547-550.

Loukas, A., Setter, P. M., Mizaels, M.R., (1998). Characterisation of Tc-cpl-1, a cathepsin L-like cysteine protease from *Toxocara canis* infective larvae. *Mol. Bioch. Paras.*, 92, 275-289.

Loukas, A., Mullin, P., Tetteh, K.A., Monees, L., Maizels, M.R., (1999). A novel C-type lectin secreted by a tissue-dwelling parasitic nematode. *Curr.Biol.*, 9, 825-828.

Miyazaki, I., (1991). *An Illustrated Book of Helminthic Zoonoses*, International Medical Foundation of Japan., 305-310.

- MagnaVal, J.F., Fabre, R., Mausieres, P., Charlet, J.P., Larrard, B., (1992). Evaluation of an immunoenzymatic assay detecting specific anti-Toxocara immunoglobulin E for diagnosis and posttreatment follow-up of human toxocariasis. *J.Clin. Mic.*, 30(9), 2269-2274.
- MagnaVal, J.F., Fabre, R., Maurieres, P., Charlet, J.P., Larrard, B., (1991). Application of the Western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Paras. Research.* 49, 697-702.
- Maizels, R.M., De Savigni, D., Ogilvie, B.M., (1984). Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. *Paras. Imm.*, 6, 23-37.
- Maizels, R.M., Kennedy, M.W., Meghi, M., Robertson, B.D., Smith, H.V., (1987). Shared carbohydrate epitopes on distinct surface and secreted antigens of the parasitic nematode *Toxocara canis*, *J. Imm.*, 139, 207-214.
- Maizels, R.M., Tetteh, K., A., Loukas, A., (2000). *Toxocara canis*: Genes expressed by the arrested infective larva stage of a parasitic nematode. *Int. J. Paras.*, 30, 495-508.
- Muñoz, G.M.A., (2002). Determinación por Western Blot de los antígenos de excreción-secreción de *Toxocara canis* que son reconocidos por anticuerpos de la clase IgE en pacientes asmáticos. Tesis de Maestría, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
- Malloy, W.F., Embil, J.A., (1978). Prevalence of *Toxocara* spp and other parasites in dogs and cats in Halifax, Nova Scotia. *Can. J. Comp.*, 42, 29-31.
- Nichols, L.R., (1956). The etiology of visceral larva migrans, I Diagnostic, morphology of infective second-stage *Toxocara* larvae. *J. Paras.*, 42(4), 349-362.
- Smith, M H., Beaver, P.C., (1953). Persistence and distribution of *Toxocara* larvae in tissues of children and mice. 12, 491-494.
- Meghji, M., Maizels, M.R., (1986). Biochemical properties of larval excretory-secretory glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *Mol. Bioch. Paras.*, 18, 155-170.
- Munira, M., Maizels, M.R., (1986). Biochemical properties of larval excretory-secretory glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *Mol. Bioch. Paras.*, 18, 155-170.
- Ninnar, W.N., Krecek, R.C., Fourie, L.J., (2002). Helminths in dog from peri-urban resource-limited community in free state province, South Africa. *Vet. Paras.*, 107, 343-349.
- Nobuaki, A., Misado, T., Hayashi, E., Susuki, R., Masumi, Sh., Kasushiro, Sh., Koichiro, F., (2003). Cerebellar ataxia due to *Toxocara* infection in mongolian gerbils, *Meriones unguiculatus*. *Vet. Paras.*, 113, 229-237.
- Oktar, N., Barcin, E., Kazandi, A., Korkmaz, M., (2002). Cerebral *Toxocara* mimicking a malignant glioma. *J. Neurol. Sc.*, 19, 1-4.

Oliveira-Sequeira, T.C.G., Amarante, A.F.T., Ferrari, T.B., Nunes, L.C., (2002). Prevalence of intestinal parasites in dogs from Sao Paulo State, Brasil. *Vet. Paras.*, 75, 56-71.

Page, A.P., Hamilton, A.J., Maizels, R.M., (1992). Lectin binding to secretory structures, the cuticle and the surface coat of *Toxocara canis* infective larvae. *Exp. Paras.*, 75, 72-86.

Page, A.P., Rudin, W., Fluir, E., Blaxter, M.L., Maizels, R.M., (1992). *Toxocara canis*: A labile antigenic surface coat overlying the epicuticle of infective larvae. *Exp. Paras.*, 75, 72-86.

Parson, J.C., Grieve, R.V., (1990). Kinetics of liver trapping of infective in murine toxocariasis. *J.Paras.*, 4, 529-536.

Parson, J.C., Coffman, .L., Grieve, R.B., (1993). Antibody to interleukin 5 prevent blood and tissue eosinophilia but not trapping in murine larval toxocariasis. *Paras. Imm.*, 15, 501-508.

Payne, P.A., Ridley, R.K., (1999). Strategic use of ivermectin during pregnancy to control *Toxocara canis* in greyhounds puppies. *Vet. Paras.*, 85, 305-312.

Payne-Jhonson, M., Maitland, T.P., Sherington, J., Shanks, D.J., Clements, P.J.M., Murphy, M.G., McLoughlin, A., Jernigan, A.D., Rowan, T.G., (2000). Efficacy of selamectin administered topically to pregnant and lactating female dogs in the treatment and prevention of adult roundworm (*Toxocara canis*) infection and flea (*Ctenocephalides felis felis*) infestations in the dams and their pups. *Vet. Paras.* 91, 347-358.

Robertson, I.D., Irwin, P.J., Lymberry, A.J., Thompson, R.C.A., (2000). The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. *Int. J. Paras.*, 30, 1369-1377.

Rubel, D., Zunino, G., Santillán, G., Winivesky, C., (2003). Epidemiology of *Toxocara canis* in the dog population from two areas of different socioeconomic status, Greater Buenos Aires, Argentina. *Vet. Paras.* 115, 275-286.

Schacher, J.F., (1957). A contribution to the life history and larval morphology of *Toxocara canis*. *J. Paras.* 25, 115-275.

Sher, A., (1995). Regulation of Mediated Immunity by Parasites: The ups and Dows of Important Host Adaptation, Molecular Approaches to Parasitology, Wiley-Liss, Inc. 431-442.

Shehada, N.N., Herbert, I.V., (1989). Variations in innata resistance to experimental *Toxocara canis* infection in two strains of mice. *Vet. Paras.*, 33(3-4), 297-307.

Smith, H.V., Kusel, J.L., Girdwood, W.A., (1983). The production of human A and Blood group like substances by in Vitro maintained second stage *Toxocara canis* larvae: their presence on the outer larval surfaces and in the excretions-secretions. *J. Clin. Exp.Imm.* 54, 625-633.

Sommerfelt, I.E., Santillán, G., López, C., Ribicich, M., Franco, A.J., (2001), Immunological and hematological response in experimental *Toxocara canis* infected pigs. *Vet. Paras.*, 96, 127-134.

Takamoto, M., Kusama, Y., Takatsu, K., Nariuchi, N., Sugane, K., (1995). Occurrence of interleukin-5 production by CD4⁺CD8⁻ (double negative) T cells in lungs of both-normal and congenitally athymic nude mice infected with *Toxocara canis*. *Imm.*, 85, 285-291.

Thakur, B.K., Murali, M.R., New, D., Smith, T.H., Volkman, D., (1998). Hypereosinophilia and markedly elevated immunoglobulin E in a 3 year old child. *Ann. All., Asth., Imm.* 80, 371-376.

Tominura, T., Yolota, M., Takiguchi, H., (1976). I. Clinical, Hematological, biochemical and gross pathological observations on monkeys inoculated with emrionated eggs of the domestic ascarid, *Toxocara canis*. *Jap.J.Vet. Sc.*, 38, 533-548.

Wade, E.S., Georgi, H.G., (1987). Radiolabeling and autoradiographic tracing of *Toxocara canis* larvae in male mice. *J. Paras.*, 73(1), 116-120.

Wang, M.Q., Jiang, H.J., Inoue, H., Mysaki, M., Yamshita, U., (1995). B. Cell mitogenic activity of *Toxocara canis* adult Word antigen. *Paras.Imm.*, 17, 609-615.

Yamasaki, H., Taib, R., Watanabe, Y., Wash M., J., Zasmy, N., Araki, K., Kim, Ch.,L.P., Kita, K., Auki, T., (1998). Molecular characterization of a cDNA encoding an excretory-secretory antigen from *Toxocara canis* second stage larvae and its application to the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Paras. Int.*, 47, 171-181.

APENDICE I

Reactivos para electroforesis

ACRILAMIDA-BISACRILAMIDA (30:0.8)

Pesar 30 g de acrilamida
Pesar 0.8 g de bisacrilamida
Disolver en agua desionizada hasta obtener 100ml.
Filtrar la solución a través de papel filtro Wathman NO.1
Almacenar a 4 C y protegerlo de la luz.

DODECIL SULFATO SODICO (SDS) 10%(p/v)

Pesar 10g de SDS.
Disolver en agua desionizada hasta obtener 100 ml
La solución obtenida debe ser clara e incolora, si no se disuelve completamente el SDS, caliente la solución hasta disolverse.

BUFFER 3.0M TRIS-HCL (pH 8.8)

Pesar 36.6g de Tris (Tris (hidroximetil) aminometano)
Disolver en 48 ml de HCL 1.0M
Ajustar la solución hasta obtener 100 ml con agua desionizada
Filtrar la solución a través del papel filtro Wathman No.1
Almacenar a 4 C.

BUFFER 0.5.M TRIS-HCL (pH 6.8)

Pesar 6.0g de Tris
Disolver en 40 ml de agua desionizada
Agregar HCl gota a gota hasta alcanzar un pH de 6.8
Ajustar a un volumen de 100 ml, con agua desionizada
Filtrar la solución a través de papel Wathman NO.1
Almacenar a 4 C

BUFFER DE CORRIMIENTO 0.25 M TRIS-HCl, 1.92M GLICINA, 1% SDS (Ph 8.3)

Pesar 3.03 g de Tris, 14.4g de glicina y 1.0g de SDS
Disolver en 1 litro de agua desionizada
Ajustar a un pH de 8.3 con HCl, gota a gota
Almacenar a temperatura ambiente.

BUFFER DE LAEMMLI

0.0625M Tris-HCl (pH 6.8)
2% SDS
5% 2-mercaptoetanol
10% glicerol
0.002% azul de bromofenol

PERSULFATO DE AMONIO 15%(p/v)

Pesar 15.0 g de persulfato de amonio
Disolver en 10 ml de agua desionizada
Esta sustancia es inestable y debe prepararse justo antes de ser usada.

TEMED (N,N,N',N',TERAMETILLENDIAMINA)

Se utiliza tal y como se compra, es estable siempre y cuando no se diluya, se debe mantener a 4 C y protegido de la luz.

PREPARACION DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA PARA LA ELECTROFORESIS.

GEL SEPARADOR

En un vaso de precipitado de 50 ml y con pipetas graduadas (todo el equipo debe estar limpio y estéril), coloque:

- 4.5 ml de agua desionizada
- 1.25 ml de Tris-HCl 3.0M pH 8.8
- 100 µl de SDS 10% (p/v)
- 4.0 ml de archilamida (30:0.8)
- 500 µl de persulfato de amonio 15% (p/v)
- 5 µl de TEMED

GEL CONCENTRADOR

En un vaso de precipitado de 50 ml y pipetas graduadas (limpias y estériles), coloque:

- 6.0 ml de agua desionizada
- 2.5 ml de Tris-HCl 0.5 pH 6.8
- 100 µl de SDS 10% (p/v)
- 4.0 ml de archilamida
- 500 µl de persulfato de amonio 15% (p/v)
- 5 µl de TEMED

APENDICE II

TINCION DE PLATA

Para un gel, prepare la siguiente solución:

De una solución de DL-Dithiotreitol (20 mg/ml) tome 12.5 µl y afore a 100 ml con etanol (50% v/v)

Mantener en agitación a 50 rpm durante 1-2 horas.

Lavar con agua destilada 150 ml/gel a 50 rpm durante una hora.

Sumergir en la siguiente solución: 200 µl de Tiosulfato de sodio pentahidratado (100mg/ml) en 100 ml de agua destilada durante 1 minuto.

Lavar con agua destilada por 20 segundos, 3 veces.

Preparar una solución de plata de la siguiente manera: pesar 0.8 g de Nitrato de plata (AgNO₃) y disuelva en 4 ml de agua destilada.
Preparar 20 ml de Hidróxido de sodio al 0.4%, mezclar con 1.5 ml de solución de amonía (0.88g NH₄OH) y agregar la solución de plata gota a gota con agitación continua, ajustar la solución hasta 100 ml.
Mantener el gel sumergido y en agitación a 70 rpm por 30 min.
Lavar con agua destilada 150 ml/gel a 70 rpm por 5 minutos, 3 veces.
Preparar la solución reveladora: mezclar 200µl de solución de formaldehído al 40% (p/v) con 2.5 ml de ácido cítrico 1%, agregar 20 µl de solución de tiosulfato de sodio y ajuste a 500 ml.
Utilizar 150 ml/gel por 10 minutos de 1 a 3 veces según aparezcan las proteínas teñidas.
Para detener la tinción desechar la solución reveladora y agregar 100 ml de la siguiente solución: metanol al 50% y ácido acético al 5% para formar 100 ml, 100 ml/gel durante 10 min.
Conservación del gel: 100 ml de etanol o metanol al 10% a 4 C por gel.

APENDICE III

REACTIVOS PARA LA TRANSFERENCIA DE PROTEINAS

BUFFER DE TRANSFERENCIA pH 8.3

Tris 25mM
Glicina 192 mM
SDS 0.05 (p/v)
Metanol 20%

TRIS BUFFER SALINO (TBS)

Mezclar :

30 ml de una solución de Na Cl 5 M
20 ml de una solución de Tris-HCl 1M pH 7.5
Aforar a 1 litro con agua desionizada

TRANSFERENCIA DE PROTEINAS.

Al finalizar la electroforesis, retirar el gel de las placas, cortar el gel concentrador y marcarlo de tal manera que se conozca su orientación.

Sumergir el gel en buffer de transferencia.

Cortar seis piezas de papel filtro Wathman No.1 y una membrana de nitrocelulosa del tamaño del gel.

Limpiar las placas de carbón del aparato con agua destilada.

Sumergir la membrana de nitrocelulosa en agua destilada, colocarla cuidadosamente sobre la superficie del agua, para que se hidrate por capilaridad, por 10 minutos.

Después sumergir la membrana en buffer de transferencia por 5 minutos.

Sumergir el papel filtro Wathman No. 1 en buffer de transferencia por 10 minutos.

Ensamblar de la siguiente manera, en el electrodo inferior:

Tres capas de papel filtro Wathman No.1

Membrana de nitrocelulosa

Gel de poliacrilamida

Tres capas de papel filtro Wathman No.1

Evitar la formación de burbujas, en caso de estar presentes retirarlas rodando una pipeta Pasteur sobre el sándwich formado.

Colocar cuidadosamente el electrodo superior sobre el sándwich.

Conectar los electrodos y comenzar la transferencia.

Al finalizar la transferencia, marcar la membrana de nitrocelulosa para saber su orientación.

Los sitios de unión de proteína restantes en la membrana de nitrocelulosa se bloquean, incubando la membrana con 5% de leche semidescremada en BS durante toda la noche a 4 C.

Nota: La unión de las proteínas a la membrana es bloqueada por aceites u otras proteínas, se debe utilizar guantes durante todo el proceso de transferencia y membranas nuevas, el buffer de transferencia no es reutilizable.

APENDICE IV

WESTERN BLOT (INMUNODETECCION(ID))

La membrana de nitrocelulosa, se corta en tiras de 3 -5 mm de ancho.

Las tiras se colocan en los pozos marcados para identificarlas.

Agregar 2 ml de dilución del suero problema en buffer de bloqueo (PBS-Leche Sueltes 5%), incubar durante 2 horas a 37 C.

Lavar con PBS-Tween 20 al 0.1% durante 1 minuto, 5 veces.

Agregar 2 ml de la dilución óptima del conjugado, incubar 1 hora a 37 C.

Lavar con PBS-Tween 20 al 0.1% durante 1 minuto, 7 veces.

Agregar 2 ml de la solución sustrato (Peróxido de hidrogeno 0.01% (v/v) Metanol 16.6% (v/v) en PBS, mantener en agitación y protegido de la luz hasta la aparición de las bandas.

Enjuagar con agua de la llave y dejar secar.

APENDICE V

REACTIVOS PARA ELISA.

PBS 10X

Pesar 80g de cloruro de sodio.

Pesar 2 g de cloruro de potasio.

Pesar 29 g de fosfato dibásico de sodio.

Pesar 2 g de fosfato monobásico de potasio.

Disolver en 700 ml de agua destilada.

Llevar a un volumen de 1000 ml con agua destilada.

SOLUCION DE CARBONATO BICARBONATO 0.05 M (BCB)

Pesar 1.59 g de carbonato de sodio.

Pesar 2.93 g de bicarbonato de sodio.

Disolver y llevar a un volumen de 1000 ml con agua destilada.
Esta solución es estable una semana a 4 C

SOLUCION REGULADORA DE CITRATOS.

Mezclar 24.3 ml de ácido cítrico 0.01M con 25.7 ml de fosfato dibásico de sodio 0.2M y 50 ml de agua destilada.

SOLUCION DE LAVADO PBS-TWEEN 20 (0.05).

Mezclar 500 ml de PBS 1X con 250µl de Tween 20

SOLUCION DE BLOQUEO.

Pesar 0.3g de albúmina sérica bovina y disolver en 10 ml de PBS 1X.
Esta cantidad es la adecuada para una placa de 96 pozos.

SOLUCION DESARROLLADORA DE COLOR.

Pesar 5 mg de OPD y disolver en 10 ml de solución reguladora de citratos.

Adicionar 10µl de peróxido de hidrogeno.

Esta cantidad es necesaria para una placa de 96 pozos.

SOLUCION DE PARO, .

Mezclar 0.6 ml de ácido ortofosfórico y 10 ml de agua destilada.
Esta cantidad es la adecuada para una placa de 96 pozos.

APENDICE VI

REACTIVOS PARA INMUNOHISTOQUIMICA

KIT UTILIZADO PARA EL DESARROLLO DE LA REACCION INMUNOHISTOQUIMICA.

CODIGO LSAB+SYS HRP, MARCA DAKO LAB SYSTEMS con peroxidasa para marcar anticuerpos de conejo, cabra y ratón.

Es un anticuerpo marcado con estreptavidina biotina para la demostración cualitativa de antígenos en tejidos incluidos en parafina, procesados en criostato o preparaciones de células.

Los reactivos incluidos en este kit son:

- 1.- Solución de peróxido de hidrógeno al 3%.
- 2.- Anticuerpo secundario biotinilado anticonejo, antiratón y anticabra en una solución salina buferada conteniendo proteína portadora y un agente antimicrobiano.
- 3.- Estreptavidina peroxidada: estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano en un buffer de fosfatos conteniendo proteína portadora y un agente antimicrobiano.
- 4.- Substrato buferado en solución, pH 7.5 conteniendo peróxido de hidrógeno y un preservador.
- 5.- 3´3´Diaminobenzidina que es la solución cromógena.

FIJADOR FORMOL NEUTRO TAMPONADO

Preparación:

Formalina10ml.
Fosfato monosódico0.4g
Fosfato disódico anhidro0.65 g
Agua destilada 90ml.
Se mantiene bien si no se forman precipitados en el fondo.

SOLUCION NORMAL DE ACIDO CLORHIDRICO.

30.9 ml. De Acido Clorhídrico
1000 ml. De agua destilada.

TRIS H Cl 0.005 M pH 7.6

TRIS base 6.1 g
H Cl .1 N 37 ml.
Agua destilada c.b.p. 1000 ml.

TBS-T

TRIS-H Cl (0.05M pH 7.6) 100 ml.
Solución Salina Fisiológica 900 ml.

Para hacerlo TBS-T agregar 100 µl de Twin 20.

Solución de ovoalbumina (Solución bloqueadora).

A 100 ml. de TBS-T agregarle la clara de un huevo y homogeneizar para integrarla a ese volumen.