



UNIVERSIDAD NACIONAL

AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**“EFECTO in vitro DE PROLACTINA, PROGESTERONA Y
17 -ESTRADIOL SOBRE LA LONGITUD Y DIÁMETRO
DE LARVAS DE *Toxocara canis*”**

T E S I S

Que para obtener el título de:

Medica Veterinaria y Zootecnista

Presenta:

Claudia Lucia Lina Nuñez

Asesor: Dr. Fernando Alba Hurtado

Co-asesor: Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán

M.P.A. Lorena Elizabeth Chávez Güitrón

Cuautitlán Izcalli, Estado de México

2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

ATN: M. en A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.
EXÁMENES PROFESIONALES

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

Efecto in vitro de prolactina, progesterona y 17-β estradiol sobre la longitud y diámetro de larvas de Toxocara canis.

Que presenta la pasante: **CLAUDIA LUCIA LINA NÚÑEZ**

Con número de cuenta: **30501165-7** para obtener el Título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de agosto de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Juan Pablo Martínez Labat	
VOCAL	Dr. Fernando Alba Hurtado	
SECRETARIO	M.V.Z. Rocío Silva Mendoza	
1er SUPLENTE	M. en C. Tiziano Santos Morín	
2do SUPLENTE	M. en C. Javier Alejandro Buendía Jiménez	

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

En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.
(Art 127 REP)

IHM/yrf

DEDICATORIAS

A MIS PADRES:

DAVID LINA PEÑA Y JUANA NUÑEZ HERNANDEZ POR SU APOYO, COMPENSIÓN, CARIÑO, CONFIANZA, SEGURIDAD QUE SIEMPRE ME BRINDARON, Y POR SER UN EJEMPLO A SEGUIR, Y POR SIEMPRE ESTAR AL PENDIENTE DE MI. LOS AMO MUCHO.

A MI HERMANO:

SONY POR TU COMPAÑÍA, LEALTAD Y APOYO, A PESAR DE MALOS ENTENDIDOS Y PELEAS, SIEMPRE SERAS MI HERMANO PEQUEÑO Y SABES QUE TE AMO TAMBIÉN.

A ADRIAN:

POR HABERME ENSEÑADO A TENER CONFIANZA EN MI, SER COMPENSIVO Y TOLERANTE, Y NUNCA HABERME DEJADO SOLA, Y POR HABERME DADO FUERZAS SIEMPRE PARA SEGUIR ADELANTE, Y SOBRE TODO, SER MI COMPAÑERO DE VIDA, POR ESO Y MÁS TE AMO AMOR.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS:

PANCHO, LUPITA, LAURA, SARA, FABIAN, ANGIE, LETY, DAMARIS, MARISA Y A TODOS LOS QUE ME FALTAN POR NOMBRAR MUCHAS GRACIAS POR SU AMISTAD, COMPAÑÍA, CARIÑO, Y POR HABER ESTADO CONMIGO EN ESTE ARDUO CAMINO Y ALENTARME A CONTINUAR.

A MIS PERRITOS:

CACHO, CLARA, CANDY, BONY Y LILI QUIENES FUERON Y SERAN SIEMPRE MI RAZÓN DE PREPARAME MÁS CADA DIA. LOS QUIERO MUCHO LATOSOS.

Y A TODOS LOS QUE ME APOYARON, GRACIAS.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por haberme abierto sus puertas para formar parte de esta magna casa de estudios para recibir educación de alta calidad, formación y preparación profesional.

Al proyecto PAPIT IN215314 de donde se obtuvo el financiamiento.

Al Dr. Fernando Alba Hurtado por dirigir y brindarme la oportunidad de ser parte de este proyecto, por su atención, tiempo y apoyo que me brindó durante el mismo.

Al Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán por las grandes contribuciones hacia mi trabajo, así como consejos y recomendaciones.

A la M.P.A. Lorena Elizabeth Chávez Güitrón por su dedicación, paciencia, apoyo en todo momento, y por enseñarme tantas cosas, compartir sus conocimientos, ser mi guía y un ejemplo a seguir.

Al M. en C. César Cuenca Verde por su apoyo técnico en el Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos para la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado: M. en C. Juan Pablo Martínez Labat, Dr. Fernando Alba Hurtado, MVZ Rocío Silva Mendoza, M. en C. Javier Alejandro Buendía Jiménez, MVZ Tiziano Santos Morín.

A mis compañeros de laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS.....	III
ABREVIATURAS.....	V
RESUMEN.....	VI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. GENERALIDADES DE <i>T. canis</i>	1
1.1.1 Morfología.....	1
1.1.2 Ciclo Biológico.....	2
1.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA TOXOCARIOSIS.....	6
1.2.1. PREVALENCIA DE <i>T. canis</i>	6
1.2.2. SEROPREVALENCIA DE <i>T. canis</i>	7
1.3. HORMONAS DE LA GESTACIÓN EN PERRAS.....	9
1.3.1. Estrógenos.....	10
1.3.2. Progesterona.....	11
1.3.3. Prolactina.....	12
2. JUSTIFICACIÓN.....	15
3. HIPOTESIS.....	16
4. OBJETIVO GENERAL.....	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
5.1. LUGAR DE REALIZACIÓN.....	17

5.2. OBTENCIÓN Y CULTIVO DE HUEVOS DE <i>T. canis</i>	17
5.3. OBTENCION DE LARVAS DE <i>T. canis</i>	17
5.4. ESTIMULACIÓN DE LAS LARVAS.....	18
5.5. MEDICIÓN DE LAS LARVAS.....	18
5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	21
6. RESULTADOS.....	22
7. DISCUSIÓN.....	30
8. CONCLUSIONES.....	33
9. REFERENCIAS.....	34

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Prevalencia de <i>T. canis</i> adultos en perros.....	7
Cuadro 2. Seroprevalencia de <i>T. canis</i> en humanos.....	8
Cuadro 3. Funciones fisiológicas de la progesterona.....	11
Cuadro 4. Efectos de la prolactina en diferentes órganos blanco.....	14
Cuadro 5. Aumento de longitud (\pm Error estándar) de larvas de <i>Toxocara canis</i> cultivadas en RPMI-1640 durante diferentes periodos en presencia de diferentes concentraciones de PRL.....	23
Cuadro 6. Aumento de longitud (\pm Error estándar) de larvas de <i>Toxocara canis</i> cultivadas en RPMI-1640 durante diferentes periodos en presencia de diferentes concentraciones de P4.....	24
Cuadro 7. Aumento de longitud (\pm Error estándar) de larvas de <i>Toxocara canis</i> cultivadas en RPMI-1640 durante diferentes periodos en presencia de diferentes concentraciones de 17- Estradiol.....	26
Cuadro 8. Diámetro (\pm Error estándar) de larvas de <i>Toxocara canis</i> cultivadas en RPMI-1640 durante diferentes periodos en presencia de diferentes concentraciones de PRL.....	27
Cuadro 9. Diámetro (\pm Error estándar) de larvas de <i>Toxocara canis</i> cultivadas en RPMI-1640 durante diferentes periodos en presencia de diferentes concentraciones de P4.....	28
Cuadro 10. Diámetro (\pm Error estándar) de larvas de <i>Toxocara canis</i> cultivadas en RPMI-1640 durante diferentes periodos en presencia de diferentes concentraciones de 17- Estradiol.....	29
Figura 1. Parásitos adultos de <i>T. canis</i>	2
Figura 2. Ciclo biológico de <i>T. canis</i>	5
Figura 3. Larva 2 de <i>T. canis</i> teñida con lugol.....	19
Figura 4. Larva 2 de <i>T. canis</i> teñida con hemalumbre de Mayer.....	20

Figura 5. Aumento de tamaño de larvas de <i>Toxocara canis</i> cultivadas en RPMI-1640 en presencia de diferentes concentraciones de PRL.....	22
Figura 6. Aumento de tamaño de larvas de <i>Toxocara canis</i> cultivadas en RPMI-1640 en presencia de diferentes concentraciones de P4.....	23
Figura 7. Aumento de tamaño de larvas de <i>Toxocara canis</i> cultivadas en RPMI-1640 en presencia de diferentes concentraciones de 17- estradiol.....	25
Figura 8. Diámetro (\pm Desviación estándar) de larvas de <i>Toxocara canis</i> cultivadas en RPMI-1640 durante diferentes periodos en presencia de diferentes concentraciones de PRL.....	26
Figura 9. Diámetro (\pm Desviación estándar) de larvas de <i>Toxocara canis</i> cultivadas en RPMI-1640 durante diferentes periodos en presencia de diferentes concentraciones de P4.....	27
Figura 10. Diámetro (\pm Desviación estándar) de larvas de <i>Toxocara canis</i> cultivadas en RPMI-1640 durante diferentes periodos en presencia de diferentes concentraciones de 17- Estradiol.....	28

ABREVIATURAS

RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640
ng	nanogramos
mL	mililitro
cm	centímetros
mm	milímetros
µm	micrómetros
pg	picogramos
µL	microlitros
L2	larva dos
IGF-1	Factor de Crecimiento Insulinico-1
LAK-1	Células “killer” Activadas por Linfocinas-1
IFN-	Interferón Natural-
iNOS	Òxido Nìtrico Sintetasa
IRF-1	Factor Regulatorio del Interferón-1
IL-2	Interleucina-2
HEPES	Ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinetanosulfónico
ANOVA	Análisis de Varianza
PRL	Prolactina
P4	Progesterona

RESUMEN

La toxocariosis canina es una de las enfermedades parasitarias más difundidas en México y en otras partes del mundo. En las perras, las larvas se encuentran enquistadas en diferentes órganos. Durante la gestación estas larvas se reactivan y migran al feto, glándula mamaria e intestino. Webster *et al.* (1958), propuso con base a observaciones indirectas que el fenómeno de reactivación larvaria es debido a cambios hormonales en las perras y que las larvas llegan al feto entre los 40 y 42 días de la gestación. Estas observaciones han sido ampliamente aceptadas, pero existen pocos estudios al respecto. Tampoco existen estudios que evalúen el efecto directo de las diferentes hormonas de la gestación sobre el parásito. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto *in vitro* de la prolactina, progesterona y 17 -estradiol sobre larvas de *T. canis*.

10000 larvas de *T. canis* se cultivaron por triplicado en medio RPMI-1640 con diferentes concentraciones de progesterona, prolactina y 17 -estradiol, en placas de 6 pozos. Los días 5, 10, 15 y 20 de cultivo, se midió la longitud y grosor de 30 larvas de cada pozo (90 larvas por concentración/día). Noventa larvas obtenidas el día cero se procesaron de la misma forma.

Las larvas estimuladas durante 5 días presentaron un aumento de tamaño dosis dependiente, las larvas estimuladas con 20 o más ng de prolactina por mL de medio tuvieron un mayor aumento de tamaño ($p < 0.05$) que las no estimuladas. El mayor aumento de tamaño se observó a 400 ng de prolactina por mL de medio. Las larvas estimuladas durante los 10 y 15 días con todas las concentraciones de prolactina utilizadas, presentaron mayor aumento de tamaño ($p < 0.05$) que las no estimuladas. Las larvas estimuladas durante todos los días del experimento y con todas las concentraciones de progesterona utilizadas, presentaron mayor aumento de tamaño ($p < 0.05$) que las no estimuladas. En general, las larvas estimuladas durante todos los días del experimento y con la mayoría de las concentraciones de 17 -estradiol utilizadas, presentaron mayor

aumento de tamaño ($p < 0.05$) que las no estimuladas. No se observaron diferencias ($p > 0.05$) en el diámetro de larvas de *T. canis* cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de prolactina, progesterona y 17 β -estradiol.

En este trabajo, se demostró que la estimulación *in vitro* de larvas de *T. canis* con prolactina, progesterona y 17 β -estradiol acelera su crecimiento. Lo anterior, muestra que las larvas de *T. canis* son sensibles a algunas hormonas de su hospedero y utilizarlas en su beneficio.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES DE *T. canis*

Toxocara canis es uno de los helmintos intestinales más importantes en perros de todo el mundo (Schneider *et al.*, 2011), produce una enfermedad llamada toxocariosis, un serio problema de salud pública en muchos países (Barriga, 1987).

La enfermedad en los humanos es adquirida por la ingestión de huevos larvados (L2p) de *T. canis* a través de la geofagia, un tipo específico de pica que incrementa el riesgo de infección, especialmente en niños que viven en casas con cachorros que no han sido desparasitados. La deficiente higiene personal así como la ingesta de vegetales crudos que provienen de cultivos contaminados con huevos larvados puede resultar en una infección crónica de baja dosis. Con menos ocurrencia, la enfermedad se asocia con el consumo de carne cruda proveniente de hospederos paraténicos potenciales, como pollos (Nagakura *et al.*, 1989), ovejas (Salem and Schantz, 1992) o conejos (Sturchler *et al.*, 1990) los cuales tienen larvas de segundo estadio enquistadas en sus tejidos, esto indica que la larva infectante puede ser liberada durante la digestión.

1.1.1 Morfología

Este parásito (Figura 1) es de color blanco, los machos adultos miden de 4 a 10 cm de longitud y las hembras hasta 18 cm. En la parte anterior presentan tres labios que no sobresalen del cuerpo. La superficie interna de cada labio puede llevar un borde dentífero o pequeños dientes. Posee aletas cervicales que le dan aspecto de punta de flecha. El extremo posterior del macho termina curvado hacia su parte ventral, presenta dos pequeñas espículas iguales de 0.75 a 0.95 mm y un estrechamiento terminal en forma de apéndice. En las hembras la vulva se abre en la región media del cuerpo y terminan en forma recta (Muñoz-Guzmán y Alba-Hurtado, 2011).



Figura 1. Macho y hembra de *T. canis*

Los huevos son subsféricos y miden de 90 por 75 μm y de color café, presentan tres capas de las cuales la más externa es muy fina con hendiduras parecidas a perforaciones a las que se denomina fosetas (Alba-Hurtado, 2007).

1.1.2. Ciclo Biológico

El ciclo biológico (Figura 2) de *T. canis* inicia con la eliminación de huevos no embrionados en el excremento de los perros parasitados (principalmente cachorros), estos huevos son resistentes y duraderos en el ambiente.

La infección ocurre cuando los perros, los humanos y otros hospederos susceptibles ingieren L2 pasiva, la eclosión ocurre en el duodeno dentro de las primeras 2-4 horas y el segundo estadio larvario atraviesa la pared intestinal; las larvas pasan a los vasos linfáticos y migran hacia los linfonodos mesentéricos (Webster, 1958b) o a capilares sanguíneos y por la vena porta llegan al hígado

dos días después (Webster 1958a). Al cuarto día llegan al pulmón viajando por la vena cava, corazón derecho y arteria pulmonar (Schneider *et al.*, 2011). A partir de ese punto, la ruta de migración y desarrollo de las larvas depende si el hospedero sea un perro joven o adulto, una perra gestante o un hospedero paraténicos como roedores, aves, humanos, etc. (Muñoz-Guzmán y Alba-Hurtado, 2011). Durante esta migración a través de los tejidos del hospedero, la larva induce una respuesta inmune de tipo humoral caracterizada por altos niveles de inmunoglobulinas del tipo IgG, IgM, IgA e IgE (Matsumura *et al.*, 1984; Elefant *et al.*, 2006).

En perros adultos y hospederos paraténicos, las larvas de segundo estadio que llegan al pulmón, regresan al corazón y se distribuyen a través de la circulación sanguínea (migración somática), llegando principalmente al músculo estriado, hígado, pulmón, riñones y cerebro donde permanecen en estado de latencia como larvas somáticas infectantes por años, hasta que mueren y se calcifican (Muñoz-Guzmán y Alba-Hurtado, 2011).

Las larvas somáticas infectantes en los hospederos paraténicos pueden reactivarse cuando estos son depredados y pueden realizar una nueva migración somática en un nuevo hospedero paraténico (Okoshi and Usui, 1968; Sasmal *et al.*, 2008; Saeed and Kapel, 2006). Después de la infección con hospederos paraténicos se observa que en algunos casos las infecciones intestinales se desarrollan directamente sin migración (Sprent, 1958). La razón más probable de esto es que la larva ya había migrado en los tejidos del hospedero previo, por tanto, ya había alcanzado una fase suficientemente madura para un desarrollo directo (Overgaauw, 1997). Estos adultos permanecen eliminando huevos por un tiempo breve en el intestino del perro adulto y posteriormente son eliminados en forma espontánea (Muñoz-Guzmán y Alba-Hurtado, 2011).

En la perra gestante, las larvas somáticas infectantes también pueden llegar a intestino y desarrollarse a fases adultas pudiendo permanecer hasta por 60 días con eliminación de huevos en la materia fecal, o bien las larvas pueden llegar a la glándula mamaria y eliminarse en el calostro y la leche, constituyendo otra fuente de infección muy importante para la camada (Muñoz-Guzmán y Alba-Hurtado,

2011). En los cachorros (menores de 12 semanas), la infección puede ocurrir antes o después del nacimiento.

Los cachorros son infectados pre-natalmente, debido a la migración de larvas de *T. canis* al útero posiblemente bajo la influencia de hormonas de la gestación (prolactina y progesterona). Las larvas somáticas infectantes en los tejidos de la perra gestante se reactivan, atraviesan la placenta y penetran a los fetos entre los días 42 y 43 de la gestación, en el hígado fetal tiene lugar una muda, transformándose en larvas de tercer estadio, las cuales, al nacer los cachorros, migran al pulmón en donde permanecen durante la primera semana de vida, la muda al cuarto estadio se da durante esta etapa o posteriormente cuando la larva llega al estómago por migración traqueal (Koutz *et al.*, 1966). Hacia el fin de la segunda semana, las larvas mudan al quinto estadio y se desarrollan rápidamente en adultos, por lo que la eliminación de huevos puede empezar en los cachorros a los 15 días de edad. Por otro lado, en la perra gestante, las larvas somáticas infectantes también pueden llegar a intestino y desarrollarse a fases adultas pudiendo permanecer hasta por 60 días con eliminación de huevos en la materia fecal, o bien las larvas pueden llegar a la glándula mamaria y eliminarse en el calostro y la leche, constituyendo otra fuente de infección muy importante para la camada (Muñoz-Guzmán y Alba-Hurtado, 2011).

En el caso de la infección pos-natal por la ingestión de huevos larvados, las larvas de segundo estadio abandonan los capilares pulmonares, penetran en los alveolos y migran por las vía respiratoria hasta la faringe en donde son deglutidas. Después de 7-9 días la larva puede ser detectada en la tráquea y en el esófago (Sprent, 1958) y es durante su paso por los pulmones, tráquea y esófago que se da la muda al tercer estadio. Las larvas permanecen un tiempo en el estómago (hasta el día 10 pos-infección). Posteriormente pasan al duodeno en donde tras la muda al cuarto y quinto estadios, se convierten en adultos sexualmente maduros entre los días 19 y 27 pos-infección (Webster, 1958b), tras la cópula, la eliminación de huevos en la materia fecal comienza entre la cuarta y quinta semana pos-infección (Muñoz-Guzmán y Alba-Hurtado, 2011). En resumen, la

fuente de infección, la edad del animal y el número de huevos ingeridos determinan la ruta de migración del parásito en el perro (Lloyd, 1998).

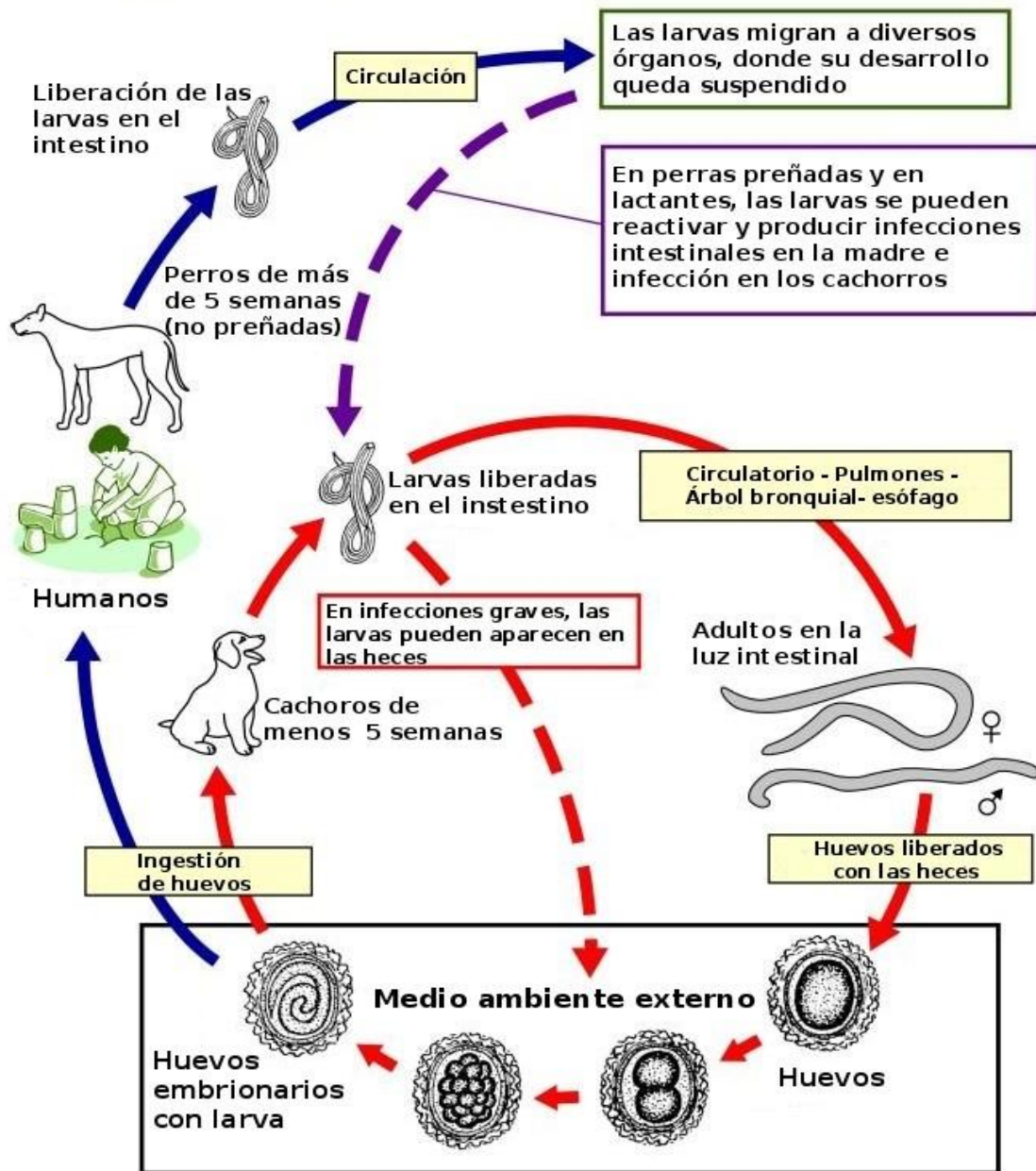


Figura 2. Ciclo biológico de *T. canis* (Dumenigo et al., 1994)

1.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA TOXOCARIOSIS

Las hembras de *T. canis* tienen una extraordinaria capacidad reproductiva, pueden producir hasta 200,000 huevos al día. Salen con la materia fecal y en unas semanas, dependiendo de la temperatura y humedad, de 9 a 11 días a 24 °C y de tres a cinco días a 30 °C en presencia de oxígeno y humedad relativa del 75% (Muñoz-Guzmán y Alba-Hurtado, 2011), en el interior del huevo se desarrolla la fase infectante (L2 pasiva). Los huevos son altamente resistentes a las condiciones medio-ambientales. Los rayos directos del sol y la desecación son letales para los huevos. En suelos húmedos, con abundante vegetación y sombríos, los huevos permanecen viables por lo menos un año (Overgaauw, 1997), mientras que en suelos secos y arenosos donde inciden directamente los rayos solares, se destruyen en pocas horas. La falta de oxígeno, la fermentación y la putrefacción matan a los huevos, por lo que aquellos que permanecen atrapados en la materia fecal fermentada son destruidos. La capa externa de los huevos los hace fácilmente adheribles a las superficies de las instalaciones, lo que facilita su permanencia en estas (Muñoz-Guzmán y Alba-Hurtado, 2011). Sin embargo, la exposición a la luz solar directa los mata.

1.2.1. PREVALENCIA DE *T. canis*

La prevalencia de *T. canis* en perros es muy alta debido, a la eficiencia de la transmisión prenatal, por lo que la mayoría de los cachorros recién nacidos están infectados con este parásito. Numerosos estudios arrojan frecuencias de toxocariosis en perros desde el 2.8% hasta más del 80% en las prevalencias (Cuadro 1), las cuales dependen de la procedencia de los animales y de los procedimientos de diagnóstico (Cordero *et al.*, 1999; Quiroz, 1984).

PAIS	TIPO DE MUESTRA	PREVALENCIA (%)	REFERENCIA
Egipto	Heces	80.6	Khalil, 1977.
Nigeria	Heces	18.5	Fashuyi, 1981.
Canadá	Heces	34	Ghadirian, 1986.
EUA	Heces	49.5	Marron and Schroeder, 1986.
Brasil	Heces y Necropsia	44.3	Chieffi and Muller, 1976.
Japón	Heces	86.6	Matsumura and Endo, 1982.
Pakistán	Heces	48.6	Umar <i>et al.</i> , 1986.
Armenia	Heces	42.8	Davidyants and Chobanyan, 1981.
Bélgica	Necropsia	38.9	Vanparijis <i>et al.</i> , 1991.
España	Heces	31	Simón and Conde, 1987.
Portugal	Heces	36.3	Aranda-Rego, 1980.
Nueva Zelanda	Heces	2.8	Dodge, 1980.
México D.F.	Necropsia	19.8	Eguia-Aguilar 1998.
México D.F.	Heces	15	Martínez-Barbosa y col., 1998.

Cuadro 1. Prevalencia de *T. canis* adultos en perros.

1.2.2 SEROPREVALENCIA DE *T. canis* EN HUMANOS

La seroprevalencia en humanos en diferentes lugares del mundo varía de un 1.6 a un 92.8% (Cuadro 2). Esto indica el alto grado de infección por esta parasitosis, sin embargo, la mayoría no presenta manifestaciones clínicas y estos solo aparecen cuando se ingieren grandes cantidades de huevos o cuando las larvas se localizan en lugares críticos como cerebro u ojos (Alba-Hurtado, 1999; Muñoz-Guzmán *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2006).

REGIÓN	SEROPREVALENCIA %	REFERENCIA
Marche, Italia	1.6	Habluetzel <i>et al.</i> , 2003.
Francia	2.0	Magnaival <i>et al.</i> , 2001.
Saitama, Japón	12.5	Yamamoto <i>et al.</i> , 2009.
Portugal	8	Cardoso <i>et al.</i> , 2013.
Durango	13	Alvarado-Esquivel, 2013.
Japón	14	Yoshida <i>et al.</i> , 1999.
Malasia	19.6	Hakim <i>et al.</i> , 1993.
Campinas, Sao Pablo, Brasil	17.9	Anaruma <i>et al.</i> , 2003.
República Eslovaca	27.4	Havasiova <i>et al.</i> , 1993.
Provincia de Cordillera, Bolivia	34	Cancrini <i>et al.</i> , 1998.
La Plata, Buenos Aires Argentina	39	Radman <i>et al.</i> , 2000.
Hawai	45	Desowitz <i>et al.</i> , 1981.
Moldova, Rumania	51.7	Cojocariu <i>et al.</i> , 2012.
Bali, Indonesia	63.2	Chomel <i>et al.</i> , 1993.
Kathmandu, Nepal	81	Rai <i>et al.</i> , 1996.
La Reunión, India	92.8	Magnaival <i>et al.</i> , 1994.

Cuadro 2. Seroprevalencia de *T. canis* en humanos.

1.3. HORMONAS DE LA GESTACIÓN EN PERRAS

Las hormonas sexuales esteroidales actúan sobre el sistema reproductivo de los mamíferos a partir de la vinculación de un receptor específico, el cual determina cambios en su fisiología reproductiva y comportamiento (Olster and Blaustein, 1989). Información reciente revela que los esteroides sexuales participan no solamente en la fisiología reproductiva, sino también en diferentes funciones, los cuales incluyen la modulación de la inmunidad, actividad cerebral, diferentes procesos metabólicos, y en el funcionamiento del pulmón y corazón. Además, tienen efectos directos sobre la modulación de diferentes funciones parasitarias (Cabrera-Muñoz *et al.*, 2009), como el curso de la infección que este produce (Escobedo-González *et al.*, 2009), así como también la respuesta inmune contra parásitos (Olster and Blaustein, 1989).

Algunas hormonas pueden regular parcialmente la respuesta inmune dirigida contra algunos agentes patógenos, esto es evidente en algunas infecciones parasitarias como la malaria, esquistosomiosis, toxoplasmosis, cisticercosis, tripanosomiosis y leishmaniosis (Escobedo-González *et al.*, 2009). Se ha demostrado *in vivo* que los esteroides sexuales (básicamente 17 -estradiol, progesterona y testosterona) pueden tener efecto sobre algunas infecciones parasitarias, los cuales confieren un dimorfismo sexual a la susceptibilidad y/o resistencia de las mismas (Lockshin, 2001). Por ejemplo, las infecciones provocadas por *Toxoplasma gondii*, *Tritrichomonas foetus*, y *Taenia crassiceps*, ostentan una mayor prevalencia e intensidad en hembras, en machos, por el contrario, las infecciones provocadas por *Leishmania sp.*, *Schistosoma sp.*, *Trichinella spiralis* y *Haemonchus contortus* son más severas (Escobedo-González *et al.*, 2004; Figallová and Prokopic, 1987; Hernández-Bello *et al.*, 2012). Otros estudios han mostrado que la mayor susceptibilidad de los ratones machos a infecciones por *Plasmodium berghei*, *Trypanosoma cruzi* y *Strongyloides venezuelensis* se revierte cuando se administran fuertes componentes estrogénicos como el estradiol (de Souza *et al.*, 2001; Libonati *et al.*, 2006; Rivero *et al.*, 2002). Por otro lado, la progesterona (que es antagónica de los estrógenos)

protege a los ratones de infecciones por *Taenia crassiceps* (Vargas-Villavicencio *et al.*, 2006). En este contexto, se ha reportado la asociación entre el estado reproductivo del hospedador y el comportamiento de *T. canis* (Quiroz, 1984).

1.3.1. Estrógenos

Los estrógenos, son hormonas esteroidales que se producen principalmente en los ovarios, y en pequeñas cantidades en testículo, glándulas adrenales y cerebro de los mamíferos. En hembras jóvenes los estrógenos promueven el desarrollo del tracto reproductivo y de los genitales externos, en la gestación aumentan el tamaño del útero, promueven el desarrollo mamario y colaboran con la relajación del cérvix. Los estrógenos también provocan el depósito de grasa en tejido subcutáneo, aumentan la vascularización de la piel y provocan retención de sodio y agua. En la pubertad, tanto en machos como en hembras el estradiol regula la hormona del crecimiento lo que determina la talla final de un individuo.

En el cerebro de los mamíferos, los estrógenos juegan un papel importante en funciones no reproductivas, tales como en la modulación de la excitabilidad neuronal, plasticidad sináptica, inducción de la sobrevivencia neuronal, expresión de respuestas regenerativas, neurogénesis regional en el adulto, regulación en la diferenciación y desarrollo neuronal. Además, se ha demostrado que tiene otras funciones en el sistema nervioso central, como el control de la actividad neuronal relacionada con los procesos de cognición, la modulación del estado de ánimo y otros estados mentales, así como el mejoramiento del aprendizaje y la memoria (Cyr *et al.*, 2002; Tripanichkul *et al.*, 2006).

En cuanto a la fisiología reproductiva, esta hormona, junto a la progesterona, juegan un papel importante en el mantenimiento de la gestación y el comienzo de la labor de parto, así como la constante modulación de la excitabilidad y contracciones del miometrio (Mesiano *et al.*, 2002). La acción estrogénica es opuesta a la estimulación progestacional y contribuye al crecimiento del útero, lo cual es de suma importancia para el desarrollo

embrionario y fetal (Dobson *et al.*, 1993; Wood, 1999; Kindahl, 2002). Además esta hormona afecta el patrón de respuesta inmune contra diferentes agentes patógenos incluyendo parásitos (Olster *et al.*, 1989).

1.3.2. Progesterona

La progesterona es una hormona esteroide que se produce en las gónadas, glándulas adrenales y cerebro. Se considera además de una hormona un neuroesteroide debido a que se produce y tiene efectos directos en el cerebro (Graham and Clarke, 1997). Esta hormona tiene diversas funciones fisiológicas en el sistema nervioso central, en el sistema nervioso periférico y en diversos órganos blanco, relacionados con el metabolismo, desarrollo y reproducción de la hembra (Pluchino *et al.*, 2006). En el Cuadro 3 se describen algunas de las funciones de esta hormona.

Tejidos	Funciones
Útero/Ovarios	Liberación de ovocitos maduros Facilita la implantación Establecimiento y mantenimiento de la gestación Embriogénesis Ciclo estral/ciclo menstrual
Glándulas mamarias	Desarrollo y crecimiento Desarrollo lóbulo-alveolar de los conductos mamarios. Secreción de leche materna
Cerebro	Regulación de la liberación de la hormona luteinizante. Regulación de la ansiedad Regulación de la depresión Conducta sexual Regula la expresión de receptores serotoninérgicos Interviene en la regulación de la secreción de la prolactina.

	Promueve la formación de mielina en las células gliales.
Hueso	Regulación de la masa ósea Previene la pérdida de la masa ósea.

Cuadro 3. Funciones fisiológicas de la progesterona (Tabla adaptada y modificada por Graham and Clarke 1997).

En el sistema inmune la progesterona parece que reduce la respuesta inmune, tanto para proteger al feto, como para disminuir la respuesta a infecciones durante el embarazo (Barrera *et al.*, 2007). En perras tiene su mayor concentración en suero alrededor de la tercera semana de gestación (Romagnoli, 2013).

1.3.3. Prolactina

La prolactina (PRL) es una hormona de naturaleza peptídica, sintetizada por la glándula pituitaria anterior y tiene múltiples funciones biológicas (Freeman *et al.*, 2002). Su primera acción reportada fue la lactogénica (Riddle *et al.*, 1933). Durante la última década, algunos estudios han demostrado que la prolactina puede también actuar como factor de crecimiento, neurotransmisor e inmunoregulador en tejidos extrapituitarios como en: cerebro, hueso, linfocitos, células de la decidua placentaria. Además de en glándula hipofisiaria, la PRL es sintetizada en el miometrio uterino, la decidua placentaria y diversas células del sistema inmunológico (Ben-Jonathan *et al.*, 1996). En el sistema inmunológico la PRL ha sido relacionada con algunos procesos de inmunidad, por lo que actualmente es considerada no sólo como una hormona sino también como una citocina. En el cuadro 4 se muestran los efectos reportados por la PRL en los diferentes órganos blanco.

Órganos blanco	Efectos
Glándula mamaria	Regula el desarrollo y crecimiento celular, aumenta la síntesis de proteínas y carbohidratos de la leche, estimula la lactogénesis, regula el tránsito de IgA a través del epitelio celular.
Hígado, riñón, piel, páncreas, hipófisis, sistema inmunológico.	Desarrollo y crecimiento celular.
Gónadas	Acciones luteotrópicas y luteolíticas, inhibe la esteroidogénesis, estimula la síntesis de receptores para gonadotropinas.
Hipotálamo	Estimula el recambio de dopamina, disminuye la secreción de GnRH
Páncreas	Estimula la proliferación y aumenta la actividad de las células por la secreción de insulina
Próstata	Estimula la proliferación, aumenta IGF-1 y sus receptores y los receptores para andrógenos
Riñón, intestino, placenta	Regula el equilibrio de agua y electrolitos
Células NK	Contribuye a la proliferación, la diferenciación y la respuesta LAK, estimula la síntesis de IFN-
Granulocitos	Estimula la expresión del gen de IRF-1 y la síntesis de iNOs
Linfocitos	Estimula la inmunidad celular, la proliferación, la síntesis de IFN- de IL-2 y de sus receptores inhibe apoptosis, regula la síntesis de iNOs, estimula la expresión del gen de IRF-1.
Monocitos	Induce la diferenciación y estimula la efectividad de presentación del antígeno.

Cuadro 4. Efectos de la prolactina en diferentes órganos blanco (Cariño *et. al.*, 2005).

La función reproductiva de la prolactina consiste en estimular y mantener la lactancia, esta hormona en perras incrementa sus niveles a partir del día 40 de la gestación, teniendo un pico durante la última semana de la misma. (Romagnoli, 2013)

Jin *et al.* (2010), demostraron que esta hormona promueve la migración de *T. canis* hacia la glándula mamaria en ratones (Dunsmore *et al.*, 1983). Sin embargo, se desconoce si las larvas son reactivadas por estimulación directa de la hormona sobre ellas (receptores) o si son reactivadas por cambios fisiológicos o tisulares inducidos por la hormona en los tejidos. En otros casos, las hormonas del hospedero regulan funciones vitales del parásito, este fenómeno ha sido llamado transregulación (Escobedo-González y Morales-Montor, 2004).

2. JUSTIFICACIÓN

La toxocariosis canina es una de las enfermedades parasitarias de los perros más difundidas en México y en otras partes del mundo. En las perras, las larvas se encuentran enquistadas en diferentes órganos. Durante la gestación estas larvas se reactivan y migran al feto, glándula mamaria e intestino. Webster *et al.* (1958), propuso con base a observaciones indirectas que el fenómeno de reactivación larvaria es debido a cambios hormonales en las perras y que las larvas llegan al feto entre los 40 y 42 días de la gestación. Aunque estas observaciones han sido ampliamente aceptadas, existen pocos estudios que comprueben esta hipótesis. Estudios como el de Jin *et al.* (2008) han mostrado el efecto indirecto de la prolactina sobre larvas de *T. canis* en ratones, sin embargo, no existen estudios que evalúen el efecto directo de las diferentes hormonas de la gestación sobre el parásito. Por lo anterior, en este estudio se pretendió demostrar que la estimulación directa *in vitro* de larvas de *T. canis* con diferentes concentraciones de prolactina, progesterona y 17 -estradiol, puede inducir cambios morfológicos que demuestren la acción directa de las hormonas sobre las larvas de *T. canis*. Lo anterior, es relevante para entender a un nivel más profundo las interacciones hospedero-parásito en esta infección.

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos de la estimulación *in vitro* con diferentes dosis de prolactina, progesterona y 17β -estradiol sobre la longitud y el diámetro en larvas 2 de *Toxocara canis*.

4. HIPÓTESIS

La adición de prolactina, progesterona y estrógenos en cultivos de larvas de *Toxocara canis* afectan su tamaño y diámetro.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. LUGAR DE REALIZACIÓN

La investigación se desarrolló en el laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES-Cuautitlán, UNAM, campo 4, en el Municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

5.2. OBTENCIÓN Y CULTIVO DE HUEVOS DE *T. canis*

Se realizaron necropsias a 30 cachorros sacrificados en el antirrábico de Cuautitlán, Edo. de México. El intestino delgado se incidió y se recolectaron gusanos adultos de *T. canis*. Los gusanos obtenidos se depositaron en un recipiente limpio y se lavaron varias veces con agua. La obtención y cultivo de los huevos de *T. canis* se realizó modificando el método de Oshima (1961). Se realizó una incisión en el tercio anterior de las hembras para obtener los úteros y posteriormente estos fueron incididos para obtener los huevos (figura 3). Los restos del parásito fueron eliminados con un colador fino, los huevos fueron lavados con SSF y resuspendidos en una solución de formol al 2% e incubados a temperatura de 27°C durante 15 días. La embrionación de los huevos fue monitoreada a partir de los 7 días.

5.3. OBTENCIÓN DE LARVAS DE *T. canis*.

Se realizó siguiendo el método desarrollado por De Savigny (1975) y modificado por Muñoz-Guzmán (2010). Los huevos lavados previa verificación de su viabilidad, fueron lavados tres veces en solución salina fisiológica por medio de ciclos de centrifugación. Posteriormente se resuspendieron en una solución de

hipoclorito de sodio al 1% por 10 minutos y se lavaron 5 veces con medio de cultivo (RPMI-1640 buferado con HEPES a pH de 7.2 con 1% de Glucosa, de L-Glutamina, Penicilina-Estreptomicina 100U/ μ g/mL y Anfotericina 2.5 μ g/mL). Para producir la eclosión de las larvas, los huevos larvados fueron agitados con una barra magnética durante 25 minutos. La suspensión de larvas resultante se colocó en aparatos de Baermann estériles y se mantuvieron en una estufa con CO₂ al 5% a 37°C por 24 horas.

5.4. ESTIMULACIÓN DE LAS LARVAS

Las larvas recolectadas de los aparatos de Baermann se lavaron y colocaron 10000 larvas en 5 mL de medio (RPMI-1640 con las hormonas a evaluar) en cada pozo de placas de cultivo celular de seis pozos (Nuncclon Delta SI Multidish 6 wells, Nunc). Desde el día 0 se adicionaron hormonas a las larvas estimuladas. Cada 48 horas se cambió el medio de cultivo que contenía hormonas recién diluidas. Las placas se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 20 días.

El procedimiento se realizó por triplicado (3 pozos) con cada una de las concentraciones de cada hormona. Las concentraciones de progesterona (Sigma, No. Catalogo P7556) fueron 0 (testigo negativo), 20, 40, 80, 400 y 800 ng/mL de medio; las de 17 β -estradiol (Sigma, No. Catalogo E4389) fueron 0 (testigo negativo), 2, 10, 45, 120 y 1200 pg/mL de medio y de prolactina (Sigma, No. Catalogo SRP4688) de 0 (testigo negativo), 2, 20, 40 y 400 ng/mL de medio.

5.5. MEDICIÓN DE LARVAS

Los días 5, 10, 15 y 20 de cultivo, se obtuvieron 100 μ l de medio con larvas de cada pozo y se mezclaron con 100 μ l de lugol (Hycel) durante 20 minutos. El día 0, realizó el mismo procedimiento mencionado anteriormente, para realizar la medición de las larvas al inicio del experimento. Posteriormente, se midió la

longitud (figura 3) de 30 larvas de cada pozo (90 larvas por concentración/día). Noventa larvas obtenidas el día cero se procesaron de la misma forma y se midieron. Del día 0 se realizó también la medición de 90 larvas.



Figura 3. Medición de longitud de una larva 2 de *T. canis* teñida con lugol

Para medir el diámetro de las larvas estimuladas se obtuvieron 100 μ l de medio con larvas de cada pozo los días 5, 10, 15 y 20 de cultivo, se centrifugaron a 280 g, se eliminó el sobrenadante y las larvas sedimentadas se mezclaron con

100 μ l de alcohol acido 96° (acido clorhídrico al 38%). Transcurridas 24 horas, se centrifugaron a 280 g y se eliminó el sobrenadante, se adicionaron 100 μ l de colorante hemalumbre de Mayer (De la Torre, 1975) durante 48 horas. Posteriormente, se midió a la altura del anillo nervioso el diámetro (Figura 4) de 20 larvas por concentración/día). Veinte larvas obtenidas el día cero se procesaron de la misma forma y se midieron los diámetros.



Figura 4. Medición del diámetro de una larva 2 de *T. canis* teñida con hemalumbre de Mayer

La medición de largo y ancho de las larvas se realizó con un microscopio óptico Olympus BX43, utilizando un software para procesamiento de imágenes (Image-Pro Plus). A la longitud o el diámetro de cada día experimental de medición le fue sustraído la longitud o el diámetro inicial correspondiente (día 0),

los resultados de esta diferencia fueron expresados como el aumento de tamaño y el aumento del diámetro en micrómetros.

5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los resultados del aumento de la longitud se realizó con un Análisis de Varianza (ANDEVA) de una sola vía y las diferencias entre medias fueron determinadas por la prueba de Fisher. Para la variable del diámetro el análisis de los resultados se realizó con un ANDEVA Factorial, para las dos variables se utilizó el software STATISTICA para Windows.

6. RESULTADOS

La longitud promedio de las larvas el día 0 fue de 390 μ m. El aumento de longitud de larvas de *T. canis* estimuladas con prolactina durante diferentes periodos se presenta en la figura 5. Las larvas estimuladas durante 5 días presentaron un aumento de longitud dosis dependiente, las larvas estimuladas con 20 o más ng de PRL por mL de medio tuvieron un mayor aumento de longitud ($p < 0.05$) que las no estimuladas. El mayor aumento de longitud se observó a 400 ng de PRL por mL de medio (figura 5A). Las larvas estimuladas durante los 10 y 15 días con todas las concentraciones de PRL utilizadas, presentaron mayor aumento de longitud ($p < 0.05$) que las no estimuladas. No se observaron diferencias entre los grupos tratados los días 10 y 15 (figura 5B y 5C). El día 20 no se observaron diferencias ($p > 0.05$) entre ninguno de los grupos cultivados en presencia o ausencia de PRL (figura 5D).

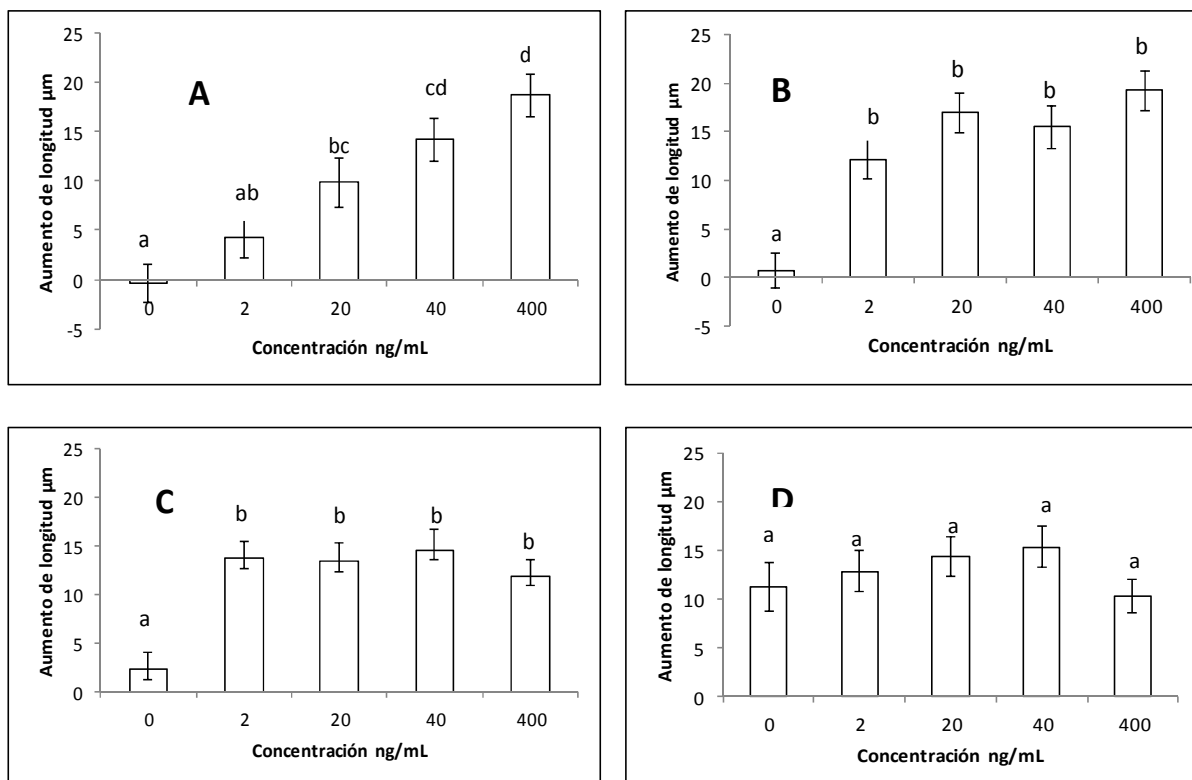
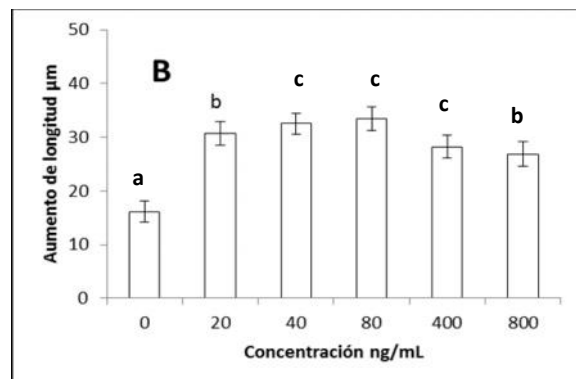
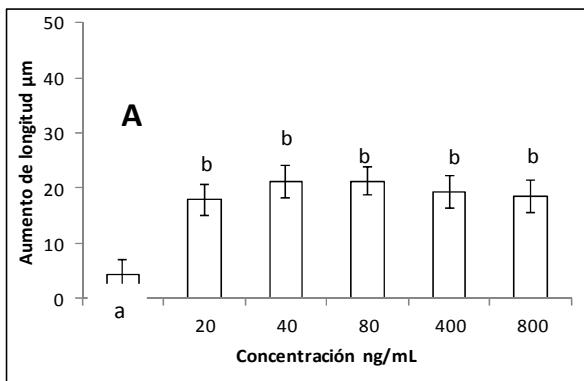


Figura 5. Aumento de longitud de larvas de *Toxocara canis* cultivadas en RPMI-1640 en presencia de diferentes concentraciones de prolactina. A) Estimuladas durante 5 días, B) Estimuladas durante 10 días C) Estimuladas durante 15 días, D) Estimuladas durante 20 días. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Días de estimulación	Concentración ng/mL				
	0	2	20	40	400
DIA 5	-0.43±1.89	4.28±2.13	4.88±2.48	14.18±2.11	18.73±2.17
DIA 10	0.64±1.76	12.18±2.08	16.93±2.07	15.50±2.22	19.24±2.06
DIA 15	2.28±1.79	13.70±1.85	13.40±1.92	14.59±2.15	11.92±1.63
DIA 20	11.30±2.50	12.86±2.12	14.29±2.01	15.36±2.13	10.29±1.98

Cuadro 5. Aumento de longitud (\pm Error estándar) de larvas de *Toxocara canis* cultivadas en RPMI-1640 durante diferentes periodos en presencia de diferentes concentraciones de PRL.

Los valores obtenidos del aumento de longitud de larvas de *T. canis* estimuladas con progesterona durante diferentes periodos se presenta en la figura 6. Las larvas estimuladas durante todos los días del experimento y con todas las concentraciones de P4 utilizadas, presentaron mayor aumento de longitud ($p < 0.05$) que las no estimuladas. No se observaron diferencias ($p > 0.05$) entre los grupos de larvas tratadas durante 5 días con las diferentes dosis de P4 (figura 6A). Las larvas cultivadas en presencia de 40 y 80 ng de P4 por mL de medio durante 10 días presentaron mayor longitud que las cultivadas con otras dosis de P4 (figura 6B). Las larvas cultivadas en presencia de 20, 40, 80 y 400 ng de P4 por mL de medio durante 15 días presentaron mayor longitud que las cultivadas con 800 ng/mL de P4 (figura 6C). Las larvas cultivadas en presencia de 40 y 80 ng de P4 por mL de medio durante 20 días presentaron mayor longitud que las cultivadas con otras dosis de P4 (figura 6D).



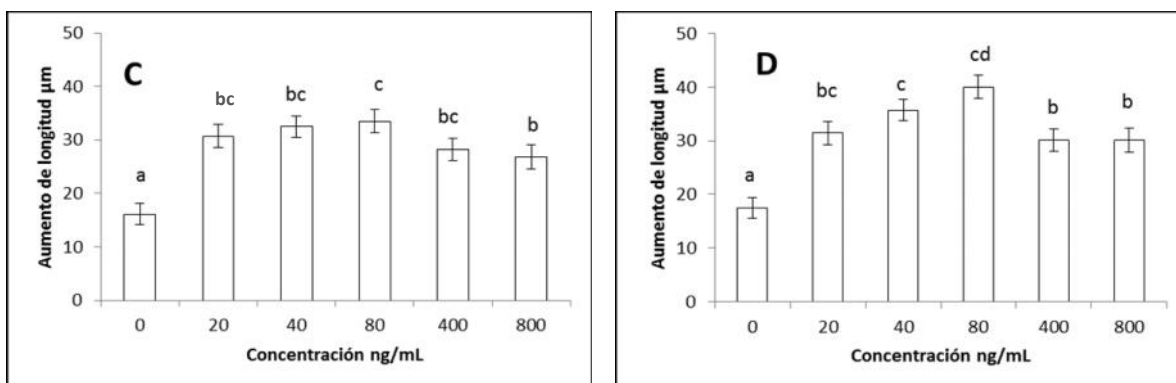


Figura 6. Aumento de longitud de larvas de *Toxocara canis* cultivadas en RPMI-1640 en presencia de diferentes concentraciones de P4. A) Estimuladas durante 5 días, B) Estimuladas durante 10 días C) Estimuladas durante 15 días, D) Estimuladas durante 20 días. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Días de estimulación	Concentración ng/mL					
	0	2	20	40	400	800
5	4.48±2.56	17.84±2.92	21.24±2.92	21.23±2.60	19.36±2.92	18.57±2.92
10	6.74±1.41	22.40±1.90	29.75±2.01	28.34±2.53	25.48±2.40	23.10±3.96
15	16.13±1.95	30.69±2.15	32.52±1.96	33.45±2.18	28.20±2.09	26.86±2.24
20	17.50±1.93	31.46±2.15	35.71±1.96	40.02±2.18	30.07±2.09	30.08±2.24

Cuadro 6. Aumento de longitud (\pm Error estándar) de larvas de *Toxocara canis* cultivadas en RPMI-1640 durante diferentes periodos en presencia de diferentes concentraciones de P4.

El aumento de longitud de larvas de *T. canis* estimuladas con 17 estradiol durante diferentes periodos se presenta en la figura 7. En general, las larvas estimuladas durante todos los días del experimento y con la mayoría de las concentraciones de 17 -estradiol utilizadas, presentaron mayor aumento de longitud ($p < 0.05$) que las no estimuladas. No se observaron diferencias ($p > 0.05$) entre los grupos de larvas tratadas durante 5 y 20 días con las diferentes dosis de 17 -estradiol (figuras 7A y 7D). Las larvas cultivadas en presencia de 1200 pg de 17 -estradiol por mL de medio durante 10 días presentaron mayor longitud ($p < 0.05$) que las cultivadas con otras dosis de 17 -estradiol (figura 7B). Las larvas cultivadas en presencia de 45 y 1200 pg de 17 -estradiol por mL de medio durante 15 días presentaron mayor longitud ($p < 0.05$) que las cultivadas con otras dosis de 17 -estradiol (figura 7C).

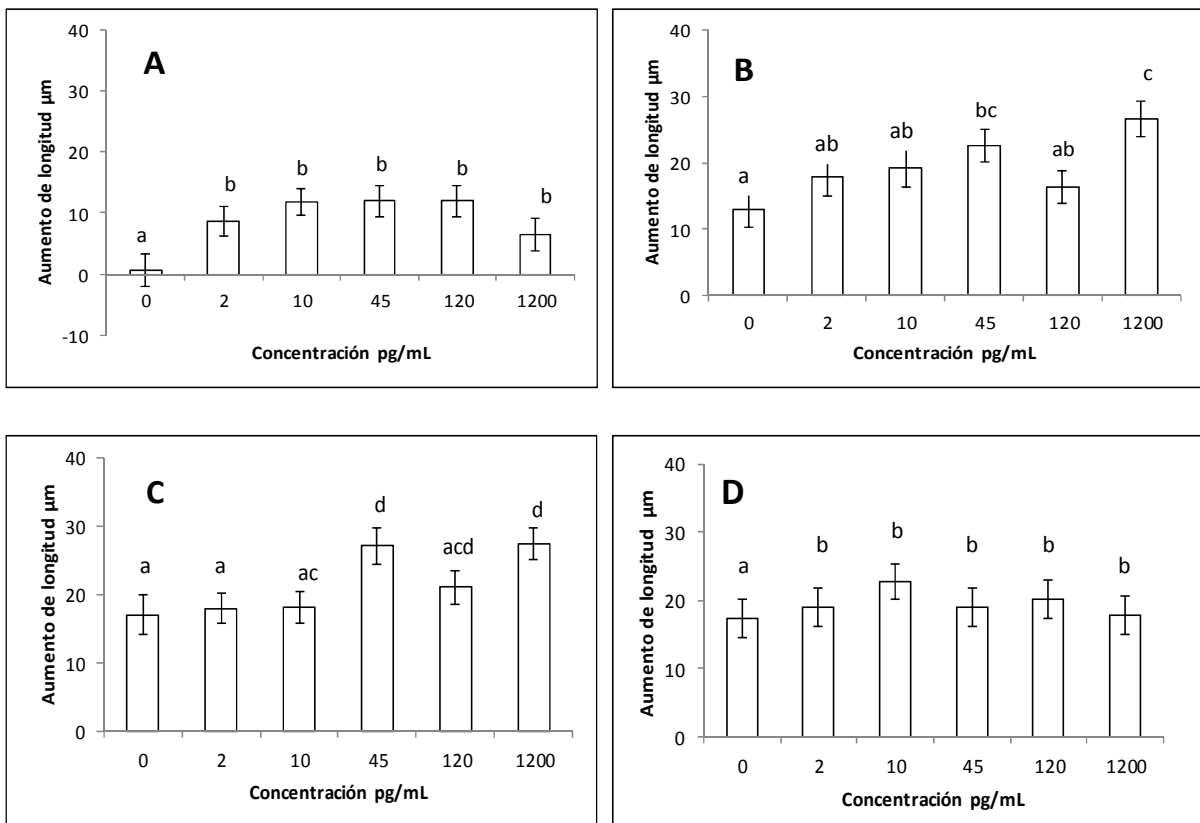


Figura 7. Aumento de longitud de larvas de *Toxocara canis* cultivadas en RPMI-1640 en presencia de diferentes concentraciones de 17- estradiol. A) Estimuladas durante 5 días, B) Estimuladas durante 10 días C) Estimuladas durante 15 días, D) Estimuladas durante 20 días. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Días de estimulación	Concentración pg/mL					
	0	2	10	45	120	1200
5	0.59±2.63	8.61±2.46	11.87±2.18	12.01±2.58	11.98±2.55	6.47±2.59
10	12.85±2.51	17.93±2.97	19.25±2.87	22.55±2.48	16.29±2.52	26.63±2.78
15	16.98±2.86	9.76±2.23	18.10±2.32	27.07±2.67	21.01±2.44	27.46±2.37
20	17.43±2.81	19.07±2.82	22.79±2.56	19.10±2.81	20.18±2.87	17.85±2.86

Cuadro 7. Aumento de longitud (\pm Error estándar) de larvas de *Toxocara canis* cultivadas en RPMI-1640 durante diferentes periodos en presencia de diferentes concentraciones de 17-Estradiol.

En las figuras 8, 9 y 10, así como en los cuadros 5, 6, 7, se presenta el diámetro de larvas de *T. canis* cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de prolactina, progesterona y 17 -estradiol respectivamente. No se observaron diferencias ($p > 0.05$) en el diámetro de las larvas de los diferentes grupos.

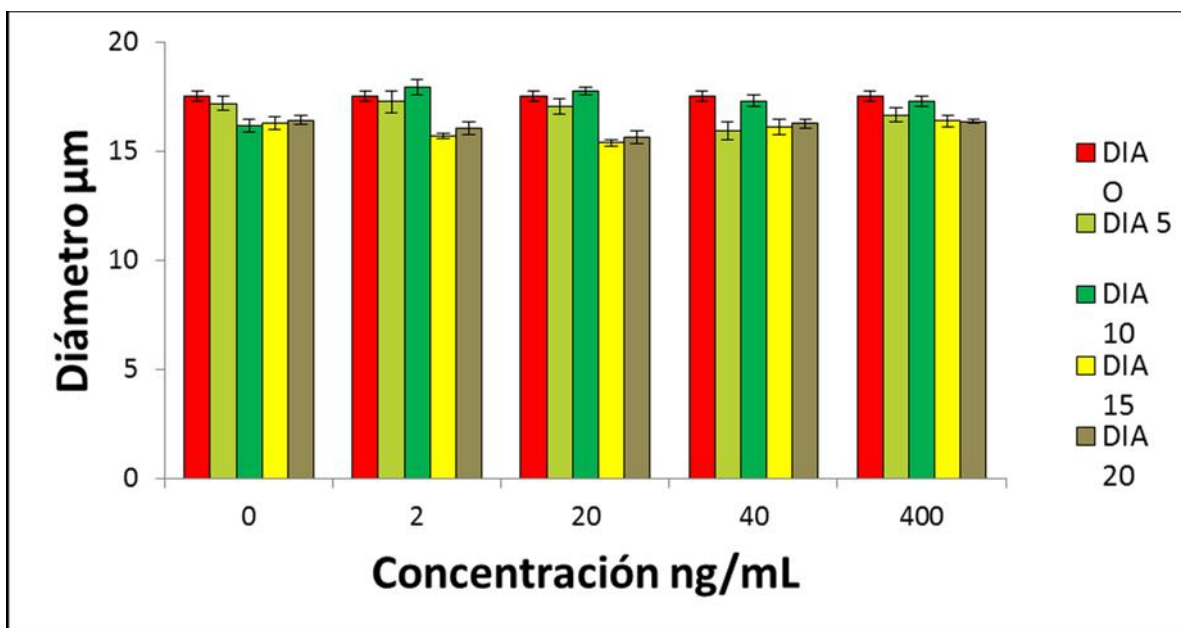


Figura 8. Diámetro (\pm Error estándar) de larvas de *Toxocara canis* cultivadas en RPMI-1640 durante diferentes periodos en presencia de diferentes concentraciones de PRL.

Días de estimulación	Concentración ng/mL				
	0	2	20	40	400
DIA 0	17.53±0.25	17.53±0.25	17.53±0.25	17.53±0.25	17.53±0.25
DIA 5	17.19±0.32	17.26±0.50	17.04±0.34	15.92±0.39	16.65±0.31
DIA 10	16.18±0.30	17.95±0.34	17.76±0.19	17.30±0.27	17.26±0.23
DIA 15	16.29±0.31	15.70±0.12	15.39±14	16.12±35	16.38±0.29
DIA 20	16.43±0.18	16.05±0.27	15.63±0.27	16.27±0.21	16.36±0.08

Cuadro 8. Diámetro (\pm Error estándar) de larvas de *Toxocara canis* cultivadas en RPMI-1640 durante diferentes periodos en presencia de diferentes concentraciones de PRL.

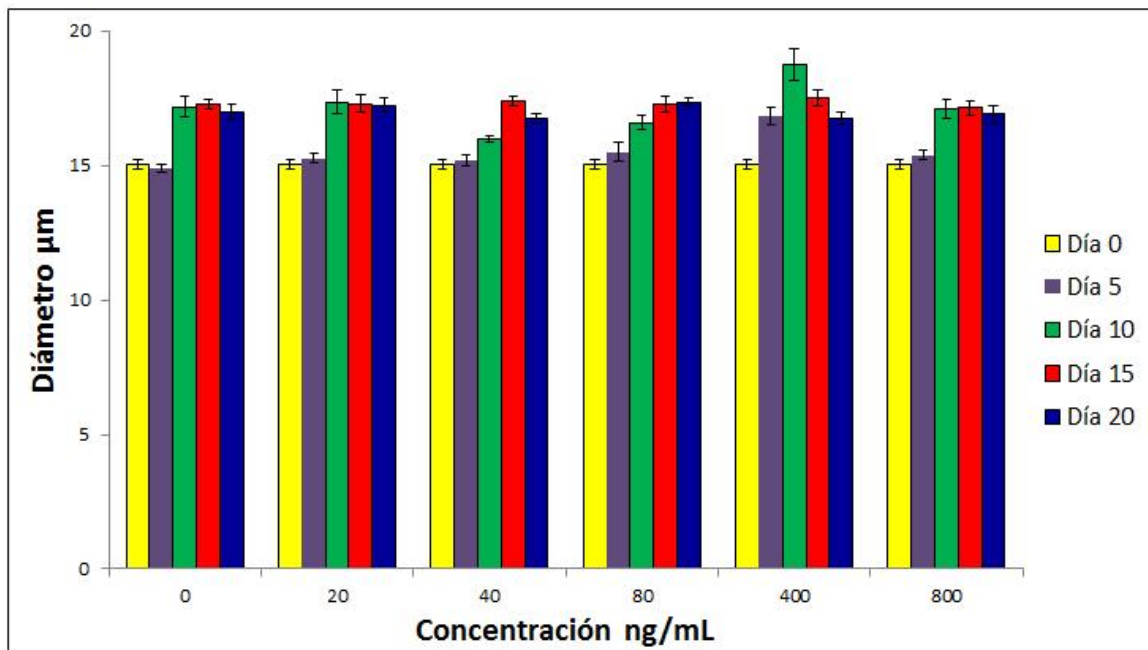


Figura 9. Diámetro (\pm Error estándar) de larvas de *Toxocara canis* cultivadas en RPMI-1640 durante diferentes periodos en presencia de diferentes concentraciones de progesterona.

Días de estimulación	Concentración ng/mL					
	0	2	20	40	400	800
0	15.04±0.19	15.04±0.19	15.04±0.19	15.04±0.19	15.04±0.19	15.04±0.19
5	14.87±0.16	15.26±0.19	15.20±0.21	15.50±0.36	16.83±0.30	15.37±0.17
10	17.16±0.38	17.35±0.44	15.98±0.13	16.58±0.27	17.97±0.40	17.09±0.35
15	17.24±0.18	17.30±0.29	17.39±0.19	17.28±0.28	17.51±0.29	17.15±0.26
20	16.98±0.28	17.22±0.26	16.74±0.17	17.34±0.15	16.72±0.23	16.90±0.33

Cuadro 9. Diámetro (± Error estándar) de larvas de *Toxocara canis* cultivadas en RPMI-1640 durante diferentes periodos en presencia de diferentes concentraciones de P4.

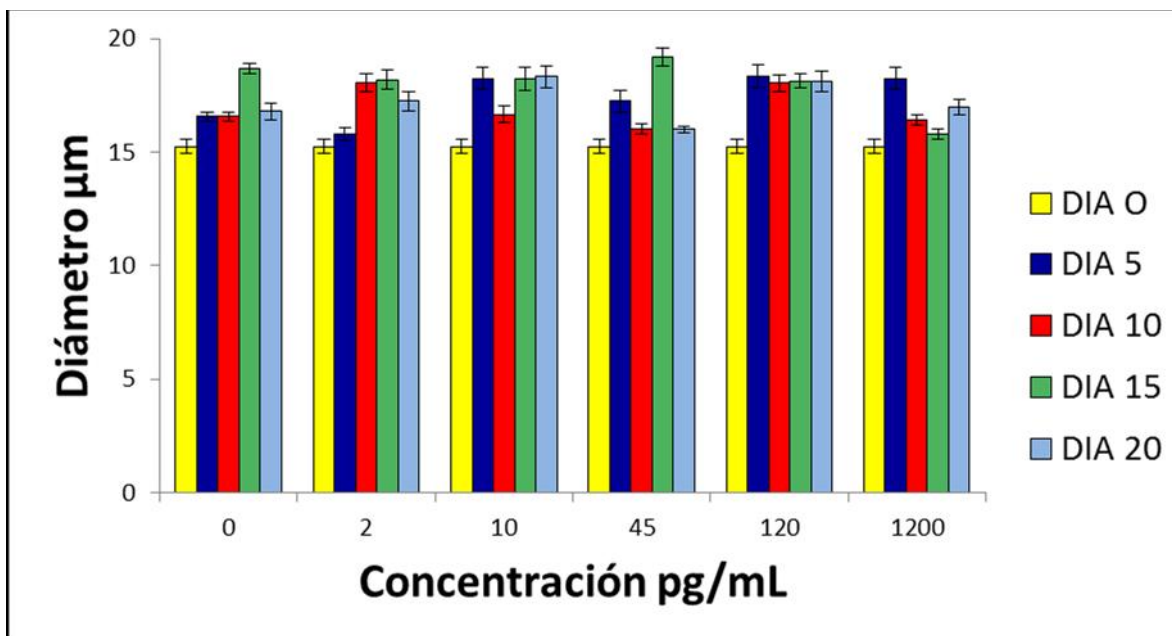


Figura 10. Diámetro (± Error estándar) de larvas de *Toxocara canis* cultivadas en RPMI-1640 durante diferentes periodos en presencia de diferentes concentraciones de 17- Estradiol.

Días de estimulación	Concentración pg/mL					
	0	2	10	45	120	1200
0	15.24±0.29	15.24±0.29	15.24±0.29	15.24±0.29	15.24±0.29	15.24±0.29
5	16.55±0.19	15.79±0.30	18.24±0.48	17.23±0.48	18.35±0.50	18.25±0.46
10	16.56±0.19	18.59±0.48	16.65±0.36	16.01±0.21	18.02±0.35	16.40±0.22
15	18.69±0.23	18.17±0.42	18.23±0.50	19.18±0.38	18.13±0.31	15.76±0.22
20	16.80±0.36	17.23±0.44	18.31±0.48	15.99±0.15	18.10±0.47	16.98±0.36

Cuadro 10. Diámetro (\pm Error estándar) de larvas de *Toxocara canis* cultivadas en RPMI-1640 durante diferentes periodos en presencia de diferentes concentraciones de 17-Estradiol.

7. DISCUSIÓN

En perras gestantes hay muchos cambios fisiológicos encaminados a mantener ese estado fisiológico, algunos de los más importantes son las variaciones hormonales principalmente de progesterona, prolactina y estrógenos. En este periodo, las larvas de *T. canis* que se encuentran en estado de latencia en diferentes órganos de las perras se reactivan y se transmiten a los cachorros a través de la placenta o del calostro/leche. Por lo anterior, se ha asociado indirectamente las variaciones hormonales a la reactivación larvaria. En este trabajo, demostramos que la estimulación *in vitro* de larvas de *T. canis* con prolactina, progesterona y estrógenos acelera su crecimiento. Lo anterior, muestra que las larvas de *T. canis* son capaces de reconocer hormonas de su hospedero y utilizarlas en su beneficio, este fenómeno ha sido llamado transregulación.

La progesterona es una hormona esteroidal que juega un papel central en aspectos reproductivos asociados al establecimiento y mantenimiento de la gestación. Esta hormona en perras es principalmente producida por los cuerpos lúteos en el ovario, por lo que son esenciales durante la preñez. La progesterona promueve la diferenciación del endometrio y la secreción glandular endometrial, mantiene la integridad del endometrio y su unión con la placenta. También inhibe las contracciones uterinas (Salehnia and Zavareh, 2013). En perras tiene su mayor concentración en suero alrededor de la tercera semana de gestación (Romagnoli, 2013). Se han reportado efectos directos de la progesterona sobre algunos parásitos. Hernández-Bello *et al.* (2011), demostraron que la progesterona inhibe *in vitro* la muda de *Trichinella spiralis*. Vargas-Villavicencio *et al.*, (2006), demostraron que la progesterona protege a los ratones de infecciones por *Taenia crassiceps*. Nuestros resultados muestran que la adición de progesterona a cultivos de larvas de *T. canis* induce su crecimiento, con lo que demostramos que la larva es capaz de reconocer la hormona y esta tiene un efecto directo sobre su desarrollo, por lo que probablemente interviene en la reactivación observada en perras gestantes.

La prolactina es una hormona polipeptídica (23 kDa) sintetizada y secretada principalmente por células especializadas de la hipófisis denominadas lactotropos. Durante la gestación tiene efecto mamotrópico (crecimiento y desarrollo de la glándula mamaria), en el posparto tiene un efecto lactogénico (síntesis láctea) y galactopoyético (secreción láctea). En las perras, su mayor concentración se encuentra en la parte final de la gestación. El aumento de tamaño observado en larvas cultivadas en presencia de prolactina a los 5 y 10 días fue dosis dependiente, siendo la de 400 ng/mL en la que se observó un mayor aumento. Sin embargo, en días posteriores de cultivo (15 y 20 días) las larvas estimuladas con 400 ng/mL disminuyeron su tamaño y las larvas estimuladas con menores concentraciones de la hormona que permanecieron 15 y 20 días en presencia de la prolactina, alcanzaron un aumento similar al observado con la concentración mayor los días 5 y 10. Lo anterior sugiere que la prolactina no solo aumenta el crecimiento de las larvas, sino que la velocidad de este aumento es también dosis dependiente.

Los estrógenos son hormonas sexuales esteroideas producidas por ovarios, placenta y en menor cantidad por glándulas adrenales y testículo. Los efectos del estradiol inducen proliferación celular, principalmente en endometrio, mama y ovario (Concanonn and Verstegen, 2005). Los resultados obtenidos muestran, que si bien el -estradiol induce un aumento de tamaño en comparación a las larvas no estimuladas, esto fue independiente de la dosis.

El mecanismo por el cual las larvas se reactivan en los tejidos somáticos de las perras está todavía en debate. Douglas y Beker (1959) observaron la presencia de larvas en cordón umbilical y placenta en fetos entre los 40 y 42 días de la gestación, por lo que propusieron que las larvas de *T. canis* en las perras se reactivaban en ese momento, ante la evidencia de que los cachorros nacen parasitados se aceptó en general esta hipótesis (Soulsby, 1982; Schnieder *et al.*, 2011). En este periodo, la hormona de la gestación que aumenta es la prolactina, por lo que se sugirió que esta hormona es la responsable de la reactivación larvaria. Sin embargo, existe evidencia de que la reactivación larvaria es previa a

la migración a los fetos. Overgaauw *et al.*, (1998), demostraron que los niveles de anticuerpos anti-*Toxocara* y de eosinófilos en sangre aumentan alrededor del día 20 de la gestación, lo que se ha asociado a una reactivación de las larvas en las perras. La hormona de la gestación con mayores niveles en sangre el día 20 es la progesterona, por lo que probablemente esta sea la responsable de la reactivación. Los resultados obtenidos muestran que la presencia de las tres hormonas evaluadas en este trabajo estimulan un aumento de tamaño de las larvas de *T. canis*, por lo que la reactivación de las larvas es el producto del efecto de la combinación de estas hormonas.

Las hormonas de la gestación tienen un efecto indirecto sobre el entorno de las larvas al modificar la respuesta inmune del hospedador, lo que podría participar en la infección transplacentaria y lactogénica a los cachorros. Se requieren realizar estudios donde se evalúen receptores hormonales en las larvas, mecanismos de activación celular y la respuesta inmune de las perras durante la reactivación larvaria para aclarar completamente el fenómeno.

8. CONCLUSIONES

Las hormonas prolactina, progesterona y -estradiol inducen *in vitro* un aumento de tamaño de larvas de *T. canis*.

Las larvas de *T. canis* son capaces de reconocer la prolactina, progesterona y -estradiol, por lo que probablemente estas hormonas intervienen en la reactivación observada en perras gestantes.

9. REFERENCIAS

1. Alba-Hurtado F. Evaluación de un modelo de toxocariasis ocular y sistémica empleando Jerbos (*Meriontes unguiculatus*). Tesis doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 1999.
2. Alba-Hurtado F y Muñoz Guzman MA. Capítulo 9: Ascariosis. en: Quiroz Romero H, Ramírez Guadarrama R, Alcalá Canto Y, Romero Callejas E, García Hernández J, Cruz Mendoza I y col. Parasitología Veterinaria Volumen II Helminths, México D.F., 2011.
3. Alba-Hurtado F. Parasitología Veterinaria. Manual de laboratorio, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 2007.
4. Alvarado-Esquivel C. Toxocariasis in waste pickers: a case control seroprevalence study. PloS one 2013; 8(1), e54897.
5. Anaruma FF, Chieffi PP, Correa CRS, Camargo ED, Silveira EP, Aranha JJB. Human toxocariasis: incidence among residents in the outskirts of Campinas, State of São Paulo, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 2003;45(5):293-294.
6. Arandas Rego A. Contamination of the soil in parks and gardens of Lisbon by eggs of *Toxocara* and other helminths. Anais da Escola Superior de Medicina Veterinaria, 1980;22:152-162.
7. Barrera D, Avila E, Díaz L. Papel inmunológico de la progesterona en el mantenimiento del embarazo. Revista de Investigación Clínica, 2007;59(2):139-145.
8. Barriga OO. A critical look at the importance, prevalence and control of toxocariasis and the possibilities of immunological control. Veterinary Parasitology, 1988;63:473-479.
9. Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW. Extrapituitary Prolactin: Distribution, Regulation, Functions, and Clinical Aspects. Endocrine Reviews, 1996; 17(6):639-669.

10. Cabrera-Muñoz E, González-Arenas A, Saqui-Salces M, Camacho J, Larrea F, García-Becerra R, Camacho-Arroyo I. Regulation of progesterone receptor isoforms content in human astrocytoma cell lines. *The Journal of Steroidbiochemistry and Molecular Biology*, 2009;113(1):80-84.
11. Cancrini G, Bartoloni A, Zaffaroni E, Guglielmetti P, Gamboa H, Nicoletti A, Genchi C. Seroprevalence of *Toxocara canis*-IgG antibodies in two rural Bolivian communities. *Parassitologia*, 1998;40:473-475.
12. Cardoso AS, Costa IMH, Figueiredo C, Castro A, Conceição MAP. The occurrence of zoonotic parasites in rural dog populations from northern Portugal. *Journal of Helminthology*, 2014;88(02):203-209.
13. Cariño C, Díaz L, Méndez-Hernández IC. La prolactina en el sistema inmunológico. *Revista de Investigación Clínica*, 2005;57(3):447-456.
14. Chieffi P and Muller E. Estudio da variacaomensal na contaminacao do solo por ovos de *Toxocara* sp. (Nematodo, Ascaroidea), na zona urban do municipio de Londrina, Estado de Paraná, Brasil. *Revista Institucional Adolfo Lutz*, 1978;38(1):13-16.
15. Chomel BB, Kasten R, Adams C, Lambillotte D, Theis J, Goldsmith R, Sutisna P. Serosurvey of some major zoonotic infections in children and teenagers in Bali, Indonesia. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 1993;24(2):321-326.
16. Cojocariu IE, Bahnea R, Luca C, Leca D, Luca M. Adult toxocariasis. *Revista Médico-Chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi*, 2011;116(2):432-435.
17. Concannon PW and Verstegen J. Some unique aspects of canine and feline female reproduction important in veterinary practice. In Proc.: 3rd World Congress of the World Small Anim. Veterinary Association, 11-14 May 2005. Mexico City, Mexico.
18. Cordero del Campillo M y col. *Parasitología veterinaria*. 1ª ed. Edit. McGraw- Hill Interamericana. Madrid, España, 1999.

19. Cyr M, Calon F, Morissette M, Di Paolo T. Estrogenic modulation of brain activity: implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 2002;27(1):12.
20. Davidyants V and Chobanyan A. Some aspects of the epizootiology and epidemiology of toxocarosis. *Tropical Medicine and Parasitology*, 1981:83-84.
21. de Souza EM, Rivera M, Araújo-Jorge TC, de Castro SL. Modulation induced by estradiol in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Parasitology Research*, 2001;87(7):513-520.
22. Desowitz R, Rudoy R, Barnwell J. Antibodies to canine helminth parasites in asthmatic and nonasthmatic children. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2009;65:361-366.
23. De la Torre y Callejas SL. Manual básico de microtecnia biológica. Edición Revolucionaria. Instituto Cubano del Libro. La Habana, Cuba, 1975:130-140.
24. De Savigny DH, Volker A, Woodruff AW. Toxocariasis serological diagnosis by enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Pathology*, 1979;32(3):284-288.
25. Dumenigo B, Lau N, Bravo JR. Prevalence of *Toxocara canis* in dogs in the city of Havana. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 1994;46:99-102.
26. Dobson H, Rowan TG, Kippax IS and Humblot P. Assessment of fetal number and fetal and placental viability throughout pregnancy in cattle. *Theriogenology*, 1993;40:411-425.
27. Dodge JS. *Toxocara canis*: the risks of infection. *New Zealand Medical Journal*, 1980;91(651):24-26.
28. Douglas JR and Baker NF. The chronology of experimental intrauterine infections with *Toxocara canis* (Werner, 1782) in the dog. *Journal of Parasitology*, 1959;45(4):43-44.
29. Dumsmore JD, Thompson RC, Bates IA. The accumulation of *Toxocara canis* larvae in the brains of mice. *International Journal of Parasitology*, 1983;47: 652-6.

30. Eguia-Aguilar P. Análisis ecológico de comunidades de helmintos intestinales de perros obtenidos en centros de control canino del DF., México. Memorias del XIII Congreso Nacional de Parasitología. Zacatecas, Zacatecas, 1998.
31. Elefant GR, Shimizu SH, Arroyo Sanchez MC, Jacob CMA, Ferreira AW. A serological follow-up of toxocariasis patients after chemotherapy based on the detection of IgG, IgA, and IgE antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2006;20(4):164-172.
32. Escobedo G, Larralde C, Chavarria A, Cerbón MA, Morales-Montor J. Molecular mechanisms involved in the differential effects of sex steroids on the reproduction and infectivity of *Taenia crassiceps*. *Journal of Parasitology* 2004;90(6):1235-1244.
33. Escobedo G, Lopez-Griego L, Morales-Montor J. Neuroimmunoendocrine modulation in the host by helminth parasites: a novel form of host-parasite coevolution? *Neuroimmunomodulation*, 2009;16(2):78-87.
34. Fashuyi SA. Diagnosis of gastro-intestinal helminths of dogs in Lagos area using the Kato-Katz technique. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa= Bulletin Des santeet Production Animals en Afrique*, 1981.
35. Figallová V and Prokopic J. The effects of host sex and sex hormones on *Trichinella spiralis* Owen, 1835 and *T. pseudospiralis* Garkavi, 1972 in the mouse. *Folia Parasitologica*, 1987;35(1):59-66.
36. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiological reviews*, 2000;80(4):1523-1631.
37. Escobedo-González G y Morales-Montor J. Trans-regularización por hormonas del hospedero de la Fisiología Parasitaria. *REB*, 2004;23 (1):12-17.
38. Graham JD and Clarke CL. Physiological Action of Progesterone in Target Tissues 1. *Endocrine reviews*, 1997;18(4):502-519.
39. Habluetzel A, Traldi G, Ruggieri S, Attili AR, Scuppa P, Marchetti R, Esposito F.. An estimation of *Toxocara canis* prevalence in dogs,

- environmental egg contamination and risk of human infection in the Marche region of Italy. *Veterinary Parasitology*, 2003;113(3): 243-252.
40. Hakim SL, Thadasavanth M, Shamilah RR, Yogeswari S. Prevalence of *Toxocara canis* antibody among children with bronchial asthma in Klang Hospital, Malaysia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1997;91(5):528.
41. Havasiova K, Dubinsky P, Stefancikova A. A seroepidemiological study of human *Toxocara* infection in the Slovak Republic. *Journal of Helminthology* 1993;67:291-296.
42. Hernández-Bello R, Nava-Castro K, Muñiz-Hernández S, Nava-Luna P, Trejo-Sánchez I, Tiempos-Guzmán N, Morales-Montor J. Beyond the reproductive effect of sex steroids: their role during immunity to helminth parasite infections. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2012;12(11):1071-1080.
43. Hernández-Bello R, Ramirez-Nieto R, Muñiz-Hernández S, Nava-Castro K, Pavón L, Sánchez-Acosta AG, Morales-Montor J. Sex steroids effects on the molting process of the helminth human parasite *Trichinella spiralis*. *BioMed Research International* 2011:2011.
44. Jin Z, Akao N, Ohta N. Prolactin evokes lactational transmission of larvae in mice infected with *Toxocara canis*. *Parasitology International*, 2008;57:495-498.
45. Khalil HM. Toxocariasis in Egypt. *The Journal of the Egyptian Public Health Association*, 1977;52(5):330.
46. Kindahl H, Kornmatitsuk B, K[^]nigsson K, Gustafsson H. Endocrine changes in late bovine pregnancy with special emphasis on fetal well-being. *Domestic Animal Endocrinology*, 2002;23:321-328.
47. Koutz FR, Groves HF, Scothorn MW. The prenatal migration of *Toxocara canis* larvae and their relationship to infection in pregnant bitches and in pups. *American Journal of Veterinary Research*, 1966;27(118):789-795.
48. Libonati RM, Cunha MG, Souza JM, Santos MV, Oliveira SG, Daniel-Ribeiro CT, Carvalho LJ, do Nascimento JL. Estradiol, but not

- dehydroepiandrosterone, decreases parasitemia and increases the incidence of cerebral malaria and the mortality in Plasmodium berghei ANKA-infected CBA mice. *Neuroimmunomodulation*, 2006;13(1):28-35.
49. Lloyd S. Toxocarosis. *Zoonoses. Biology, Clinical Practice and Public Health Control*, 1998:841-854.
50. Lockshin MD. Invented review: sex ratio and rheumatic disease. *Journal of Applied Physiology*, 2001;92(1):2366-2373.
51. Magnaval JF, Michault A, Calon N, Charlet JP. Epidemiology of human toxocariasis in La Reunion. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1994;88:531-533.
52. Magnaval JF, Glickman LT, Dorchies P, Morassin B. Highlights of human toxocariasis. *The Korean Journal of Parasitology*, 2001;39(1):1-11.
53. Martínez-Barbabosa I, Fernández-Presas AM, Vázquez-Tsuji O, Ruiz-Hernández A. Frecuencia de *Toxocara canis* en perros y áreas verdes del sur de la ciudad de México, Distrito Federal. *Veterinaria México*, 1998;29:239-244.
54. Marron JA and Schroeder RJ. Survey of *Toxocara canis* infection rate in impounded dogs in Los Angeles County. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1978;172(6):713-713.
55. Matsumura K and Endo R. Investigation of antibodies against *Toxocara canis* in naturally infected puppies. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale. A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie*, 1982;253(1):139-143.
56. Matsumura K and Endo R. Detection of circulating toxocaral antigens in dogs by sandwich enzyme-immunoassay. *Immunology*, 1984;51:609-612.
57. Mesiano S, Chan EC, Fitter JT, Kenneth K, Yeo G, Smith R. Progesterone withdrawal and estrogen activation in human parturition are coordinated by progesterone receptor A expression in the myometrium. *The journal of clinical endocrinology and metabolism*, 2002;87(6):2924-2930.
58. Muñoz-Guzmán MA, del Rio-Navarro BE, Valdivia-Anda G, Alba-Hurtado F. The increase in seroprevalence to *Toxocara canis* in asthmatic children is

- related to cross-reaction with *Ascaris suum* antigens. *Allergologia et Immunopathologia*, 2010;38(3):115-21.
59. Nagaruka K, Tachibana H, Kaneda Y, Kato Y. Toxocariasis possibly caused by ingesting raw chicken. *Journal of Infectious Diseases*, 1989;160:735-736.
60. Olster DH and Blaustein JD. Development of steroid-induced lordosis in female guinea pigs: effects of different estradiol and progesterone treatments, clonidine, and early weaning. *Hormones and Behavior*, 1989;23(1):118-129.
61. Okoshi S and Usui M. Experimental studies on *Toxascaris leonina*. VI. Experimental infection of mice, chickens and earthworms with *Toxascaris leonina*, *Toxocara canis* and *Toxocara cati*. *Nihon juigaku zasshi. The Japanese Journal of Veterinary Science*, 1968;30(3):151.
62. Oshima, T. Standardization of techniques for infecting mice with *Toxocara canis* and observations on normal migration routes of the larva. *Journal of Parasitology*, 1961;47:652-656.
63. Overgaauw PA. Aspects of *Toxocara* epidemiology: toxocarosis in dogs and cats. *Critical Reviews in Microbiology*, 1997;23:223-251.
64. Overgaauw PA, Okkens AC, Bevers MM, Kortbeek LM. Incidence of patent *Toxocara canis* infection in bitches during the oestrous cycle. *Veterinary Quarterly*, 1998;20(3):104-107.
65. Pluchino N, Luisi M, Lenzi E, Centofanti M, Begliuomini S, Freschi L, Genazzani AR. Progesterone and progestins: effects on brain, allopregnanolone and β -endorphin. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2006;102(1):205-213.
66. Quiroz RH. *Parastología y Enfermedades Parasitarias de Animales Domésticos*. 1ª ed. Edit. Limusa. México, D.F., 1984.
67. Radman N, Archelli S, Fonrouge R, Guardis MDV, Linzitto O. Human toxocarosis. Its seroprevalence in the city of La Plata. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2000;95:281-285.

68. Rai SK, Uga S, Ono K, Nakanishi M, Shrestha HG, Matsumura T. Seroepidemiological study of *Toxocara* infection in Nepal. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 1996;27:286-290.
69. Riddle O, Bates RW, Dykshorn SW. The preparation, identification and assay of prolactin a hormone of the anterior pituitary. *American Journal of Physiology Legacy Content*, 1933;105(1):191-216.
70. Rivero JC, Inoue Y, Murakami N, Horii Y. Androgen-and estrogen-dependent sex differences in host resistance to *Strongyloides venezuelensis* infection in Wistar rats. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2002;64(6):457-461.
71. Romagnoly S. Recent advances in canine female reproduction. *World Congress WSAVA/FECAVA/CSAVA*, 2006:675.
72. Saeed IS and Kapel CM. Population dynamics and epidemiology of *Toxocara canis* in Danish red foxes. *Journal of Parasitology*, 2006;92(6):1196-1201.
73. Salem G and Schantz P. Toxocaral visceral larva migrans after ingestion of raw lamb liver. *Clinical Infectious Diseases*, 1992;15:743-744.
74. Sasmal NK, Acharya S, Laha R. Larval migration of *Toxocara canis* in piglets and transfer of larvae from infected porcine tissue to mice. *Journal of Helminthology*, 2008;82(03):245-249.
75. Schnieder T, Laabs EM, Welz C. Larval development of *Toxocara canis* in dogs. *Veterinary Parasitology*, 2011;175:193-206.
76. Salehnia M and Zavareh S. The effects of progesterone on oocyte maturation and embryo development. *International Journal of Fertility and Sterility*, 2013;7(2):74.
77. Smith H and Noordin R. Diagnostic limitations and future trends in the serodiagnosis of human toxocariasis. *Toxocara: the enigmatic parasite*, 2006:89-112.
78. Simon F and Conde L. Datos epidemiológicos sobre la toxocariosis y larva emigrante visceral en la provincia de Salamanca. In V Congreso Nacional de Parasitología, Salamanca, 1987:397-398.

79. Soulsby E.J.L. Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals, 6^a ed. Edit. Bailliere Tindall. London, 1982.
80. Sprent J.F. Observations on the development of *T. canis* (Werner, 1782) in the dog. Parasitology, 1958;47:184-209.
81. Stürchler D, Weiss N, Gassner M. Transmission of toxocariasis. Journal of Infectious Diseases, 1990;162:571-572.
82. Tripanichkul W, Sripanichkulchai K, Finkelstein D.I. Estrogen down-regulates glial activation in male mice following 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine intoxication. Brain Research, 2006;1084(1):28-37.
83. Umar S, Rabbani A, Mian M, Afzal M, Saeed K. Efficacy of levamisole, mebendazole and pyrantelpamoate against natural infection of *Toxocara canis* in dogs. Pakistan Veterinary Journal, 1986;6(3):127-128.
84. Vanparijs O, Hermans L, Flaes L. Helminth and protozoan parasites in dogs and cats in Belgium. Veterinary Parasitology, 1991;38(1):67-73.
85. Vargas-Villavicencio J.A, Larralde C, Morales-Montor J. Gonadectomy and progesterone treatment induce protection in murine cysticercosis. Parasite Immunology, 2006;28(12):667-674.
86. Webster (a) G.A. A report on *Toxocara canis* Werner, 1782. Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science, 1958;22(8):272.
87. Webster (b) G.A. On prenatal infection and the migration of *Toxocara canis* Werner, 1782 in dogs. Canadian Journal of Zoology, 1958;36(3):435-440.
88. Wood C.E. Control of parturition in ruminants. Journal of Reproduction and Fertility Supplement, 1999;54:115-126.
89. Yoshida M, Shirao Y, Asai H, Nagase H, Nakamura H, Okazawa T, Akao N. A retrospective study of ocular toxocariasis in Japan: correlation with antibody prevalence and ophthalmological findings of patients with uveitis. Journal of Helminthology, 1999;73(04):357-361.