



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y**  
**DE LA SALUD ANIMAL**

"EVALUACIÓN DEL EFECTO INMUNONUTRICIONAL DE LA L-  
GLUTAMINA EN GATOS INFECTADOS CON *TOXOCARA CATI*"

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS

**PRESENTA:**

**Varón Rodríguez Barragán**

**TUTORA:**

**Yazmín Alcalá Canto FMVZ**

**COMITÉ TUTOR:**

**Carlos Gutiérrez Olvera FMVZ**

**María Esther Ortega Cerrillo COLPOS**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**MÉXICO, D.F. DICIEMBRE 2015**



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.

## DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A mi padre por haberme apoyado siempre y  
por haberme dado todo en la vida, no  
tengo como agradecerles lo que  
han hecho por nosotros.

A mis hermanos y hermanas, por ser la fuente  
de mi inspiración, las llevo  
en el corazón.

A mis amigos por brindarme su ayuda  
y apoyo en todo momento, siempre  
están en mis pensamientos.

GRACIAS!!!

## **EVALUACIÓN DEL EFECTO INMUNONUTRICIONAL DE LA L-GLUTAMINA EN GATOS INFECTADOS CON *Toxocara cati***

La oxidación juega un papel importante sobre la parasitosis gastrointestinal. L-glutamina es un aminoácido esencial que posee propiedades de eliminación, antiinflamatorio y radical. El objetivo de esta investigación es En esto tuvo como objetivo investigar el efecto de la L-glutamina en la inflamación intestinal y sus efectos antioxidantes durante una infección experimental de gatos con *Toxocara cati*. Los gatitos fueron asignados aleatoriamente a cuatro grupos: (1) 2 mg L-glutamina; (2) 4 mg L-glutamina; (3) control; (4) 5 mg / kg de peso corporal pirantel. Todos los animales fueron muestreados para las heces y la sangre durante un período de 70 días después de la administración experimental de huevos infectantes de *T. cati*. La excreción de huevos de *Toxocara*, capacidad antioxidante, generación de malondialdehído (MDA), los niveles de proteína de enzimas antioxidantes incluyendo superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) y los niveles de factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) se ensayaron. Ambas dosis de L-glutamina fueron igualmente eficaces en la reducción de la MDA, aumentar las expresiones de enzimas de SOD y GPx, la capacidad y disminuir los niveles de antioxidantes de TNF- $\alpha$ .

## EVALUATION OF THE EFFECT IMMUNONUTRITIONAL L-GLUTAMINE IN CATS INFECTED WITH TOXOCARA CATI

oxidation play major roles upon gastrointestinal parasites. L-glutamine, an essential aminoacide, possesses anti-inflammatory and radical scavenging properties. Herein we aimed to investigate the effect of L-glutamine upon intestinal inflammation and its antioxidant effects during an experimental infection of cats with *Toxocara cati*. Kittens were randomly assigned to four groups: (1) 2 mg L-glutamine; (2) 4 mg L-glutamine; (3) control; (4) 5 mg/kg BW pyrantel pamoate. All animals were sampled for faeces and blood during a 70-day period after experimental administration of *T. cati* infective eggs. Excretion of *Toxocara* eggs, antioxidant capacity, generation of malondialdehyde (MDA), protein levels of antioxidative enzymes including superoxide dismutases (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) and levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) were assayed. Both doses of L-glutamine were equally effective in lowering MDA, increase the enzyme expressions of SOD and GPx, the antioxidant capacity and decrease levels of TNF- $\alpha$ .

Keywords: L-glutamine, *Toxocara cati*, oxidation, antioxidant.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Huevo de *Toxocara cati*.

**Figura 2.** Ciclo biológico de *Toxocara spp.*

**Figura 3.** Estructura del ABTS+ antes y después de la reacción con el antioxidante.

**Figura 4.** Producción de cromóforo ABTS.

**Figura 5.** Excreción de huevos de *Toxocara cati* en gatos infectados experimentalmente y complementados o no con L-glutamina.

**Figura 6.** Generación de malondialdehído en gatos infectados experimentalmente con *Toxocara cati* y complementados o no con L-glutamina.

**Figura 7.** Captación del radical ABTS+ en gatos infectados experimentalmente con *Toxocara cati* y complementados o no con L-glutamina.

**Figura 8.** Actividad de la enzima glutatión peroxidasa en gatos infectados experimentalmente con *Toxocara cati* y complementados o no con L-glutamina.

**Figura 9.** Actividad de la enzima glutatión peroxidasa en gatos infectados experimentalmente con *Toxocara cati* y complementados o no con L-glutamina.

**Figura 10.** Niveles de TNF-  $\alpha$  en gatos infectados experimentalmente con *Toxocara cati* y complementados o no con L-glutamina.

## LISTA DE CUADROS

**Cuadro 1:** Coprología ( $X \pm EE$ )

**Cuadro 2:** MDA ( $X \pm EE$ )

**Cuadro 3:** Trolox ( $X \pm EE$ )

**Cuadro 4:** Glutation Peroxidasa ( $X \pm EE$ )

**Cuadro 5:** Superoxido Dismutasa ( $X \pm EE$ )

**Cuadro 6:** TNF-ALFA ( $X \pm EE$ )

## **ÍNDICE**

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| DEDICATORIA.....           | I   |
| RESUMEN.....               | II  |
| ABSTRACT.....              | III |
| LISTA DE FIGURAS.....      | IV  |
| LISTA DE CUADROS.....      | V   |
|                            |     |
| 1. ANTECEDENTES.....       | 1   |
| 2. JUSTIFICACIÓN.....      | 14  |
| 3. HIPÓTESIS.....          | 15  |
| 4. OBJETIVOS.....          | 15  |
| 5. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 15  |
| 6. RESULTADOS.....         | 25  |
| 7. DISCUSIÓN.....          | 34  |
| 8. CONCLUSIONES.....       | 39  |
| 9. RECOMENDACIONES .....   | 39  |
| 10. BIBLIOGRAFÍA .....     | 40  |



## **ANTECEDENTES**

Las enfermedades parasitarias se encuentran ampliamente distribuidas en el mundo y muchas constituyen una zoonosis. En especial los helmintos gastrointestinales de gatos.

*Toxocara canis* y *Toxocara cati* es el áscaris que más comúnmente causa larva migrans. De hecho, se ha empezado a reconocer a este nemátodo como un iotros gatos de la zona y para la salud pública en general.

El sistema gastrointestinal de los felinos está expuesto de manera constante a la colonización de varios agentes patógenos, entre los cuales los helmintos son los más comunes, siendo causa frecuente de enfermedad en gatos adultos y en cachorros [1].

## **TOXOCARIASIS**

La toxocariasis es una enfermedad parasitaria en el ser humano, que se produce por la ingestión de huevos larvados del nematodo [2].

Las hembras producen 200 x 10<sup>3</sup> huevos/día, expulsándolos en heces de animales infectados; su desarrollo es durante 14 a 21 días y permanecen infectantes por años [3, 4]. Clínicamente se manifiesta de forma visceral, neurologica y ocular. La intensidad de los signos clínicos depende del número de larvas y la respuesta del paciente.

***Toxocara spp***

## **MORFOLOGÍA**

Son nematodos de color blanco, los machos 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 dentígero 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 termina en forma recta [5].

### **CICLO BIOLÓGICO**

En general, las larvas de *Toxocara canis* o *Toxocara cati* eclosionan 2-4 hrs después de la ingestión de huevos embrionados en el duodeno, donde penetran las paredes intestinales para entrar en el sistema circulatorio. En el hígado se alcanza alrededor de 24 hrs después de la infección a través de la circulación portal mediante los capilares venosos. Las larvas continúan la migración al corazón, después de 12 hrs migran al pulmón a través de la arteria pulmonar. Posteriormente la ruta de migración depende de varios factores tales como la edad y el estado inmune del hospedero, así como la dosis infecciosa ingerida. Las larvas penetran la pared alveolar y pueden migrar hacia la faringe a través de los bronquiolos y llegar a la tráquea. Posterior a la deglución, las larvas pasan al siguiente estadio transformándose en helmintos adultos en el intestino. Este proceso se desarrolla cerca de 7-15 días después de la migración traqueal. Otra posibilidad de la migración desde el pulmón está entrando en el sistema circulatorio de nuevo después de la penetración de las paredes alveolares, en los que las larvas se distribuyen de forma pasiva al tejido somático [6]. En gatos el

ciclo de *Toxocara* sp. sigue los mismos pasos que en los perros, sin embargo, la *Toxocara* sp. no se transmite a través de la placenta, sin embargo, la transmisión del parásito a través de las glándulas mamarias supone una elevada fuente de infección [7] (Figura 2).

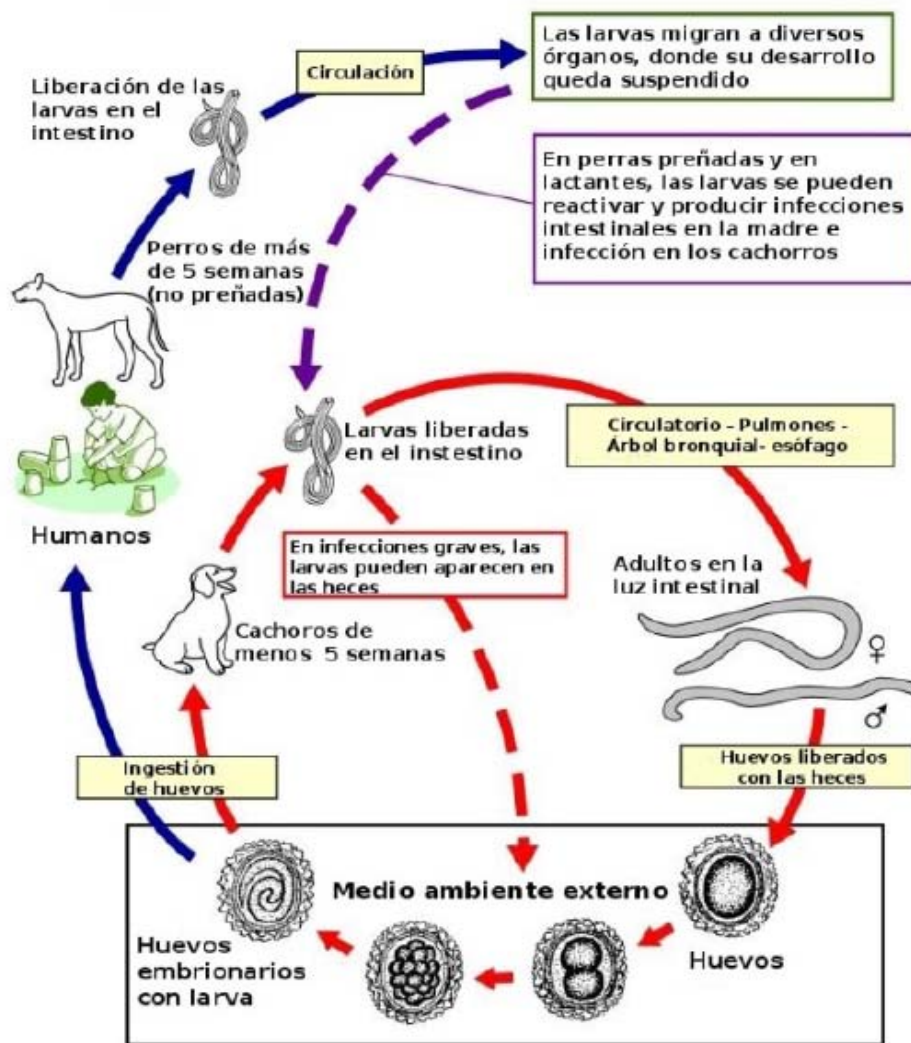


Figura 2. Ciclo biológico de *Toxocara* spp. (Rus MC, 2014)

## **PATOGENIA**

Las fases adultas en el intestino se alimentan de contenido intestinal por lo que compiten con el huésped por los nutrientes y dependiendo del número pueden producir diferentes grados de desnutrición. La presencia de los adultos en la luz intestinal provoca irritación, está por un lado induce disminución de la absorción de nutrientes y por otro lado, es la responsable de la diarrea y vómito que se observa en algunos cachorros. Además ejercen una acción mecánica al obstruir el flujo normal del contenido intestinal, las infecciones pre-natales masivas pueden ocasionar obstrucción intestinal y muerte de camadas completas.

Las larvas ejercen una acción traumática cuando migran por los tejidos, la gravedad de las lesiones depende del número de larvas y del órgano por el que migran. En los pulmones producen ruptura de capilares y de alvéolos. Por otra parte durante la migración, las larvas producen una serie de glicoproteínas antigénicas que atraen células inflamatorias que contribuyen a la formación de lesiones granulomatosas eosinofílicas en los tejidos por donde pasan. En cachorros con infección prenatal o lactogénica intensa, estas lesiones producidas por el paso de las larvas en hígado y pulmones pueden provocar la muerte de los cachorros en las primeras dos semanas de vida [5].

## **TRATAMIENTO**

El tratamiento puede hacerse con piperacina a dosis de 110 a 200 mg/kg pv, la cual tiene muy buena efectividad para eliminar a las fases adultas pero no a las fases larvarias. El nitroscanato a dosis de 50 mg/kg pv tiene efectividad contra fases adultas y parcialmente contra fases larvarias. El febendazol a dosis de 100

mg/kg pv durante tres días elimina eficazmente a las fases adultas y a dosis de 50 mg/kg pv por 14 días reduce significativamente el número de larvas titulares en los perros adultos. La ivermectina a dosis de 200 µg/kg pv y la selamectina epicutánea a dosis de 6-12 mg/kg pv utilizadas durante la gestación y después del parto han sido utilizadas exitosamente para la reducción de la transmisión prenatal a través de la placenta [5].

### **RESPUESTA INMUNOLÓGICA DEL HOSPEDERO ANTE EL PARÁSITO**

Los helmintos parásitos presentan mayor tamaño, tienen estructuras y ciclos de vida más complejos, por lo que esto hace que presenten mayor número de antígenos y mayor especificidad por cada etapa de desarrollo del parásito [8].

Las infecciones por nematodos tienden a la cronicidad, los animales adquieren inmunidad después de repetidas infecciones y se caracteriza por: eliminación más temprana de los parásitos, disminución en la ovoposición, menor talla parasitaria, desarrollo incompleto e impedimento en la muda larvaria. En general, los nematodos son bien tolerados y causan leves efectos patogénicos; aunque cuando se presentan cargas parasitarias excesivas, se presenta patología y enfermedad. Los mecanismos patogénicos involucrados incluyen pérdida de sangre debido a la alimentación parasitaria, competencia por nutrientes o disfunción nutricional, inmunopatología, interferencia con la motilidad intestinal o control neuromuscular, bloqueo del intestino, etc.

La respuesta inmune contra nematodos se caracteriza por presentar niveles elevados de anticuerpos IgE, eosinofilia y mastocitosis, respuestas que se atribuyen a la subpoblación de linfocitos T Helper 2 (Th2), también hay síntesis

local de anticuerpos IgA e IgG1 a nivel sistémico. Los linfocitos Th2 secretan una amplia variedad de citocinas que favorecen la respuesta humoral y la diferenciación de ciertas poblaciones celulares. Por ejemplo, la interleucina 4 (IL-4) estimula la síntesis de IgE y la interleucina 5 (IL-5) facilita el desarrollo y activación de los eosinófilos. Estos últimos resultan más eficaces en la eliminación de los helmintos que otros tipos de leucocitos, ya que la proteína básica principal de los gránulos del eosinófilo puede ser más tóxica para los helmintos que las enzimas proteolíticas y los intermediarios reactivos del oxígeno producidos por los neutrófilos y los macrófagos. La expulsión de algunos nemátodos intestinales podría deberse a mecanismos dependientes de la IL-4, aunque no bien definidos, pero que aparentemente no requieren la participación de IgE. A nivel del tracto digestivo, la respuesta Th2 estimula el músculo liso, incrementa la motilidad y el desarrollo de diarrea, lo que provoca la expulsión de los parásitos [9].

En cuanto a la respuesta inmune innata, algunas veces está relacionada con la edad del animal [10]. Por ejemplo, hay diferencias físico-químicas en el medio intestinal de hospederos adultos comparados con los jóvenes. En gatos infectados con *Toxocara cati*, los parásitos adultos son expulsados del intestino cuando el animal tiene entre 3 y 6 meses de edad y no se establecen nuevas infecciones en animales mayores a 6 meses. Las células fagocíticas pueden activarse y secretar sustancias microbidas para atacar a los helmintos, pero ellos han desarrollado mecanismos de protección como la secreción de proteasas y enzimas detoxificantes, así como la presencia de tegumentos gruesos que les permiten resistir los mecanismos citocidas de los neutrófilos y macrófagos, y debido a que son excesivamente grandes no pueden ser fagocitados. El sistema del

complemento puede activarse, pero también es ineficaz debido a los mecanismos de evasión desarrollados. En las infecciones por nematodos gastrointestinales hay proliferación de las células caliciformes y mayor secreción de moco, respuestas que pueden estar bajo el control de los linfocitos T $\gamma\delta$ . [9].

## **INMUNONUTRICIÓN.**

El concepto de inmunonutrición se refiere a la adición de nutrientes específicos a los regímenes de nutrición enteral o parenteral, en concentraciones mayores que las normales, para lograr un efecto farmacológico que regule la función inmunitaria y así mejorar los resultados en comparación con algunas fórmulas isocalóricas e isonitrógenas, principalmente en pacientes sometidos a cirugía, traumatismos y/o infección.

Estos nutrientes específicos, además de regular la respuesta inmunitaria del hospedador, ayudan a controlar la reacción inflamatoria, regular el balance de nitrógeno y la síntesis de proteínas, por lo que desempeñan un papel clave en la recuperación de un paciente que por diversos motivos se encuentre en una situación inmunodeficiente.

El intestino es el órgano inmunitario más grande del cuerpo, ya que contiene el 65% del tejido inmunitario y más del 80% de las células productoras de inmunoglobulinas. Por tal motivo, éste se ha convertido en un punto clave en la atención en las unidades de cuidados intensivos, y el grado y la forma en que se utiliza para el apoyo nutrición tiene inferencias importantes en el pronóstico del paciente [11].

Las dietas inmunoestimuladoras deben surtir efecto regulando estos dos procesos, promoviendo una respuesta inmunitaria bien dirigida y ordenada por parte del tejido linfático asociación al intestino (GALT), y suprimiendo una liberación difusa y exagerada de radicales superóxido y citocinas provenientes de la activación no específicas de los neutrófilos y macrófagos.

La interacción entre los nutrientes y el sistema inmunitario es sólo diferenciada en el tubo digestivo, donde el sistema inmunitario de las mucosas está continuamente procesando comida y antígenos microbianos en un ambiente cambiante. Los nutrientes de la dieta afectan la respuesta de la mucosa, en parte mediante la influencia en la movilización y tránsito a través de dicho ambiente. El metabolismo de los nutrientes provee un estímulo esencial para la inducción, diferenciación y conservación del sistema inmunitario en las mucosas. La falta de ingesta de dieta enteral deteriora la Ig A de la mucosa, el número de células que contengan Ig A y el nivel de Ig G, incrementándose el reclutamiento de neutrófilos.

Varios tipos de alimentos tienen un efecto estimulante en el sistema inmunitario, cuya pérdida está relacionada con la supresión parenteral, la cual conduce a una gran expresión de la P – selectina en el tracto intestinal y de la E – selectina en el pulmón facilitando respuesta inflamatoria.

La supresión de la respuesta inmunitaria está específicamente relacionada con linfocitos totales bajos en las placas de Peyer, capa intraepitelial y lámina propia. Esta reducción de linfocitos se acompaña de la alteración proporcional de células T, promedio bajo de CD4 Y CD8, baja expresión de receptor de células T y niveles reductivos de Ig A intestinal.



El sistema de inmunidad de los intestinos tiene características distintas de las del sistema inmunitario general. El GALT contiene inmunocitos especializados, como los linfocitos T intraepiteliales y las células epiteliales presentadoras de antígeno, que no se encuentran en muchos lugares. A diferencia del sistema inmunitario generalizado, la respuesta inflamatoria debe ser limitada o regulada en el intestino. La respuesta inflamatoria de las células T parece ser controlada por la activación de una subpoblación de CD8 reguladoras que es única en el sistema inmunitario de las mucosas. La respuesta inmunitaria local puede ser regulada por la circulación de las células reactivas a antígenos de otros sitios, sugiriendo la participación de la interacción de nutrientes. El microambiente de los inmunocitos conduce la respuesta inmunitaria hacia la respuesta de los Th1 o Th2.

La nutrición enteral con inmunonutrientes ha demostrado conservar la integridad de la mucosa intestinal, cuyos beneficios se reflejan en una disminución de la cantidad y gravedad de infecciones, de la morbilidad infecciosa y de utilización de recursos en terapias intensivas [12].

## **INMUNONUTRIMENTOS**

Existen diversos nutrientes utilizados para regular la función inmunitaria tales como: Arginina, ácidos grasos omega-3, Zinc, prebióticos, vitamina A y la glutamina, por mencionar algunos.

## L - GLUTAMINA

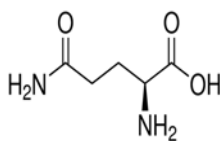


Figura No 3. Estructura química de la L-glutamina (tomado de Gil A., 2010)

La L-glutamina (Figura 3) es el aminoácido más abundante en el plasma, se considera un aminoácido esencial de manera condicional en ciertas situaciones clínicas donde la síntesis endógena es insuficiente para mantener fondos de reserva intracelular libres. Dado que, tanto los aminoácidos no esenciales como los esenciales se convierten en L-glutamina y alanina en las células musculares, estos dos aminoácidos son de especial importancia.

La L-glutamina es importante para la regulación de la proliferación celular y la apoptosis. Como un metabolito central en la transaminación de aminoácidos a través de la vía alfa –cetoglutarato y del ácido glutámico, la L-glutamina también promueve la síntesis de proteínas específicas.

Se sintetiza de manera primaria en el músculo, y de manera parcial, en el pulmón, de donde es liberada como el vehículo principal para el intercambio del nitrógeno de aminoácidos entre tejidos y órganos. El músculo esquelético produce en forma constante L-glutamina y alanina para liberarlos hacia los órganos dependientes de L-glutamina: intestino, células de la sangre, hígado y riñones, como una fuente de nitrógeno y energía. La producción endógena de L-glutamina es de 50 a 80 g/24 h en los adultos. Sin embargo, ciertos tejidos tienen tasas muy altas de captación y metabolismo de la L-glutamina, en especial en estados catabólicos como la sepsis y las lesiones graves, donde grandes cantidades de L-glutamina son

liberadas del tejido muscular y se eleva el consumo de éste aminoácido por parte de las células inmunitarias como los macrófagos, linfocitos y neutrófilos.

La L-glutamina es el combustible de preferencia para aquellas células que presentan una división celular muy rápida como los inmunocitos, por tanto, desempeña una función central en la respuesta mediada por las células T y otras funciones de mediación inmunitaria, y constituye un combustible oxidante para las células epiteliales, mucosas y los enterocitos intestinales.

La utilización de L-glutamina determina el control del balance de ésta a través del hígado: así que, cuando éste cambia de la utilización neta a la producción neta, o viceversa, los cambios en la actividad de la glutaminasa son el determinante primario sin cambios en el flujo de la sintetasa de L-glutamina. Sin embargo, por medio del mantenimiento de una actividad alta de ambas enzimas, el hígado es capaz de retirar, o agregar, L-glutamina a la circulación según se requiera y por tanto, desempeña una función principal en el mantenimiento de la homeostasis de L-glutamina. [13]

La L-glutamina interviene en la síntesis de glutatión y de taurina, que son dos de los antioxidantes más importantes del organismo. La L-glutamina regula la producción de taurina en el riñón, cuya función, entre otras, es detoxificar a los oxidantes clorados mediante la formación del compuesto estable de taurina-cloroamina, la cual protege a la célula de la apoptosis. Los altos niveles de taurina en el citosol de los neutrófilos migrantes aseguran que este antioxidante se libere hacia el tejido dañado, donde se necesita neutralizar a los radicales libres.

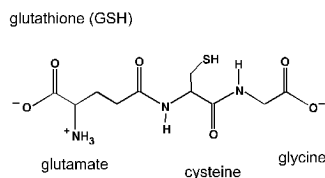


Figura 4. Estructura química de glutathione (Tomado de Gil, 2010)

La cisteína, glicina y L-glutamina como precursor del ácido glutámico, son los aminoácidos que participan en la biosíntesis del tripéptido glutatión. Se ha demostrado que el ácido glutámico es el limitante de la velocidad, incluso en presencia de cisteína, cuando el glutatión se degrada en el riñón, hígado o intestino. El glutatión está presente dentro de las células en una forma reducida y en una forma oxidada y presenta concentraciones altas en la mayoría de las células de los mamíferos. Desde el punto de vista cuantitativo tiene muchas funciones protectoras y metabólicas. Es el eliminador de desechos endógenos más importante contra las dañinas especies reactivas de oxígeno (ROS). También protege la función enzimática normal al mantener los grupos tiol de las proteínas en su forma reducida. El estado redox del glutatión resulta crítico en varios sucesos biológicos que incluyen la activación transcripcional de genes específicos, la modulación de la señal de transducción regulada por el estado de redox, la regulación de la proliferación celular, la apoptosis y la inflamación. [14]

En las enfermedades críticas y en el traumatismo quirúrgico, se producen un estrés oxidativo que conduce a un riesgo de mayor daño tisular, debido a la producción aumentada de ROS y el agotamiento de los antioxidantes naturales como el glutatión en el músculo esquelético. Esto es un indicativo de estrés

oxidativo y durante la sepsis, la activación de neutrófilos y macrófagos en el sistema inmunitario puede conducir a una producción excesiva de ROS, que puede causar la degradación del ADN, la inhibición de la glucólisis y de la síntesis de ATP, junto a una activación del ciclo redox del glutatión. La L-glutamina es limitante de la velocidad, y puede invertir esta inhibición del metabolismo oxidativo hepático mediada por la síntesis de glutatión. De manera adicional, la provisión de L-glutamina preserva las concentraciones de glutatión en la mucosa intestinal y la L-glutamina enteral estimula la síntesis intestinal de glutatión, lo cual resulta en una liberación fraccional de glutatión por parte del intestino. [13]

## **GLUTAMINA Y LA FUNCIÓN INMUNOLÓGICA**

La L-glutamina es un potente estimulante inmunitario, por ser el sustrato principal de las células del sistema inmunológico, existe una correlación significativa entre el aporte de glutamina, la velocidad de proliferación linfocítica y el contenido intracelular de glutatión. La falta de L-glutamina deprime la actividad de las células asesinas activadas por linfocinas y lleva a una baja del glutatión intracelular.

La L-glutamina retrasa la apoptosis, tal vez por un mecanismo mediado por el efecto antioxidante del glutatión.[15]

### **Linfocitos**

La L-glutamina es un precursor conocido de purinas y pirimidinas, las que a su vez actúan como precursoras en la síntesis de nucleótidos y como combustibles primarios de los linfocitos. Hay altas tasas de utilización de L-glutamina incluso en linfocitos en reposo. Se ha demostrado que la suplementación con L-glutamina aumenta significativamente la proliferación de linfocitos estimulada con

fitohemaglutininas, la cual se necesita con rapidez cuando los linfocitos están activados [12].

## **JUSTIFICACIÓN**

Los animales que están infectados con *Toxocara cati* pueden no manifestar signos clínicos, es decir, presentar una parasitosis subclínica. La importancia que tiene esta presentación se basa en que existe una contaminación continua del ambiente del animal y por lo tanto los gatos más jóvenes pueden presentar diarrea, mala absorción de nutrientes y predisposición a otras infecciones. Asimismo, cuando se manifiestan los signos clínicos, pueden presentarse problemas de obstrucción intestinal a causa de la alta prolificidad de las hembras de este género. Dentro de las acciones patogénicas de este nemátodo están los efectos traumáticos, obstructivos, mecánicos y expoliadores. Estas actividades inducen la generación de especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico y moléculas inflamatorias que aumentan la severidad de los signos clínicos y repercuten sobre la adecuada nutrición de los animales. Actualmente se utilizan antihelmínticos para controlar esta parasitosis. No obstante, la inflamación intestinal puede persistir a causa de la hiperplasia del tejido que se regenera después de las infecciones por nematodos gastrointestinales. A causa de ello, se consideró necesario estudiar la actividad inmunomoduladora de productos nutraceuticos que puedan contrarrestar la inmunopatología intestinal que se presenta en la toxocariosis felina. Se sugirió estudiar el potencial inmunomodulador de la L-glutamina en vista de la escasa información con la que se cuenta actualmente sobre el uso de este aminoácido en gatos infectados con *Toxocara cati*.

## **HIPÓTESIS**

La complementación de L-glutamina en la dieta de los gatos, reflejará cambios en las concentraciones sanguíneas de malondialdehído, superóxido dimutasa, glutatión peroxidasa y factor de necrosis tumoral-alfa, así como en la cantidad de huevos de *Toxocara cati* excretados en las heces.

## **OBJETIVO**

1. Evaluar el efecto nutraceutico y sobre la carga parasitaria de la L-glutamina en gatos infectados experimentalmente con *Toxocara cati*.

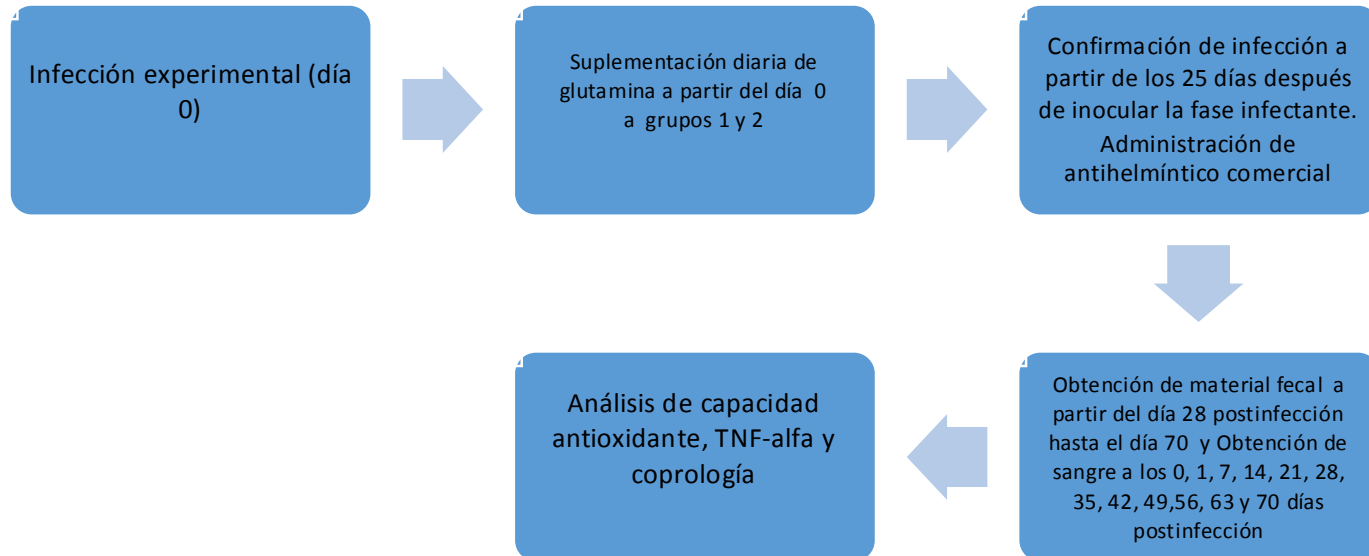
## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

2. Determinar la actividad antioxidante de la L-glutamina.
3. Determinar el efecto de la L-glutamina sobre la carga parasitaria.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Este trabajo se llevó a cabo en el área de usos múltiples y laboratorio del Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

### Diagrama de bloques



### Animales de experimentación

Se utilizaron 20 gatos clínicamente sanos (temperatura, frecuencia cardíaca, y respiratoria dentro de rangos normales) con edades de uno a dos meses y un peso promedio de 500 gr. Estos animales se mantuvieron en un mismo ambiente, para evitar posibles factores que interfirieran en los resultados.

Todos los animales fueron tratados de acuerdo a las Especificaciones Técnicas para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Norma Oficial Mexicana y de la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals de los Estados Unidos. [16]

Todos los gatos fueron desparasitados al llegar a las instalaciones con oxibendazol y niclosamida (Vitaminthe reforzado®) a una dosis de 22.5mg/kg de oxibendazol y 120 mg/kg de niclosamida vía oral y fipronil 0.25%(Frontline® Spray) vía cutánea. A los 20 gatos se les realizó la prueba SNAP® Triple Felino (leucemia, VIF, Dirofilaria) del laboratorio IDEXX.



Se dio una semana de adaptación antes de comenzar con la toma de muestras fecales, sanguíneas y dosificación de los gatos e inoculación parasitaria

### **Consideraciones de alojamiento:**

El alojamiento de los animales se adecuó a lo especificado por Loveridge en su documento "Comfortable Environmentally Enriched Housing For Domestic Cats". Se utilizó un cuarto con las dimensiones necesarias para proporcionar a cada gato su espacio vital, el cual según "El Centro Waltham de Nutrición para Mascotas", debe de ser de 1.0 m<sup>2</sup> por animal, más espacio en niveles superiores de por lo menos 2.0 m de altura. El cuarto fue provisto de lo necesario para el bienestar de los gatos, los cuales contaron con espacios para esconderse, rascaderas, repisas alfombradas, hamacas y juguetes adecuados para gatos. Se colocaron 16 areneros, 20 platos de comida y 20 platos para agua. Se les alimentó con croquetas para gatitos (Cat chow) y agua ad libitum. Los gatos fueron socializados diariamente, ofreciendo periodos de juego en conjunto e individual.

### **Glutamina**

Se adquirió L-glutamina grado reactivo (Sigma Aldrich G3126-1KG CAS 0000056859).

## **DISEÑO EXPERIMENTAL**

Se formaron 4 grupos de 5 gatos cada uno:

Grupo 1 (2 machos y 3 hembras): el día de la infección experimental recibió 2 mg de glutamina por gato diariamente vía oral con una jeringa con agua durante 10 semanas.

Grupo 2 (2 machos y 3 hembras): el día de la infección experimental se le administraron 4 mg de glutamina por gato diariamente vía oral con una jeringa con agua durante 10 semanas.

Grupo 3 (2 machos y 3 hembras): el día de la infección experimental se administró únicamente agua diariamente durante 10 semanas.

Grupo 4 (3 machos y 2 hembras): el día 25 post-infección se administraron 5 mg/kg de pamoato de pirantel por vía oral.

### **Obtención de la fase infectante de *Toxocara cati***

La obtención y cultivo de huevos de *T. cati* se realizó modificando el método descrito por Oshima en 1961 y De Savingy en 1975. Se colectaron helmintos adultos de *T. cati* de mascotas parasitadas y tratadas con piperazina y también de necropsias. Se utilizó también un stock de huevos con larva 2 de *T. cati* del Departamento de Parasitología de la FMVZ, UNAM. Una vez recolectado todos los helmintos de *T. cati* las hembras se separan y se les extrajo el útero por una incisión al final del primer tercio del cuerpo. Los uteros se colocaron en una solución salina fisiológica, se obtuvieron los huevos y con un colador de pero fino se eliminaron los restos del parásito. Los huevos se sometieron a varios lavados con PBS 1x centrifugado a 2500 rpm durante 5 minutos. Los huevos sedimentados

se resuspendieron en solución PBS-formaldehído al 2% y se incubaron a 27°C por 28 días para la obtención de la forma infectiva (huevos larvados). Al final se observa en el microscopio la viabilidad por la movilidad de las larvas dentro del huevo.

La determinación de la viabilidad se realizó de la siguiente manera por triplicado; se colocaron 20 µl en un porta objetos y se contó al microscopio el número de huevos con larva móvil en su interior, se sumaron, se sacó el promedio y se multiplicó por 50 para obtener el número de huevos viables por ml de cultivo.[17].

### **Infección experimental**

A los animales de los 4 grupos se les inocularon con jeringa vía oral aproximadamente 1,000 huevos embrionados (con larva 2) suspendidos en solución salina.

#### **Muestreo coprológico**

A partir del día 25 post-infección se recolectaron muestras de heces, en un promedio de 3 a 5 g por animal directamente del recto y se depositaron en bolsas de polietileno. Una vez que se obtuvieron muestras positivas, la colecta se realizó cada 7 días. Las muestras se identificaron individualmente y se conservaron en refrigeración hasta su procesamiento en el laboratorio. Las muestras colectadas fueron procesadas mediante la técnica de flotación y de McMaster para la cuantificación de huevos por gramo de heces [18].

### **Muestras sanguíneas**

La obtención de las muestras sanguíneas se realizó por medio de tubos Vacutainer® con y sin anticoagulante cada 7 días. Las muestras sanguíneas fueron conservadas en refrigeración hasta el momento de su análisis. La sangre completa se centrifugó a 2000 RPM durante 20 minutos para la obtención de suero y se conservó en congelación hasta su análisis.

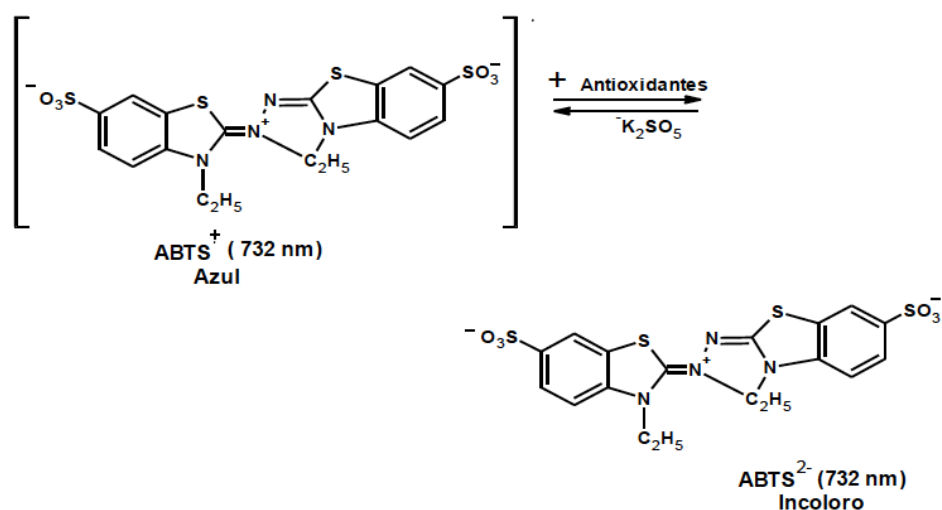
### **Determinación de niveles de malondialdehído (MDA)**

La determinación de MDA se realizó a través de la formación de derivados del ácido tiobarbitúrico, que siguió los siguientes pasos: precipitación de las proteínas séricas, liberación de MDA unido a las proteínas, reacción con el ácido tiobarbitúrico, determinación de los complejos MDA-ácido tiobarbitúrico por análisis espectrofotométrico y, finalmente, eliminación de interferencia de otros aldehídos, como el furfuraldehído, para el cálculo final [19].

### **Determinación de la capacidad antioxidante de la L-glutamina**

Se utilizó el ensayo ABTS [20] usando el Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico 97%, (Sigma-Aldrich, México) como antioxidante de referencia. La generación del radical ABTS<sup>+</sup> constituye la base de uno de los métodos espectrométricos que han sido aplicados para medir la actividad antioxidante total de soluciones o sustancias puras y mezclas acuosas. El ensayo original de ABTS<sup>+</sup> estaba basado en la activación de la metilmioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS para producir un radical catión, en presencia o ausencia de

antioxidantes. Éste fue criticado debido a que la reacción rápida de los antioxidantes, contribuye a la reducción del radical ferrilmioglobina. Un formato más apropiado para el ensayo consiste en la técnica de decoloración, en la cual el radical es generado directamente en una forma estable antes de la reacción con los antioxidantes (Figura 5) [21].



**Figura 5. Estructura del ABTS<sup>+</sup> antes y después de la reacción con el antioxidante (Zuleta et al. 2009)**

La técnica mejorada para la generación del radical catión ABTS<sup>+</sup>, implica la producción directa del cromóforo ABTS<sup>+</sup> verde-azul (Figura 6) a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>). Éste presenta tres máximos de absorción a las longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm. La adición de los antioxidantes al radical pre-formado lo reduce a ABTS. De esta manera el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical catión ABTS<sup>+</sup> está determinado en función de la concentración y el tiempo; así como del

valor correspondiente usando el TROLOX como estándar, bajo las mismas condiciones.



**Figura 6. Producción de cromóforo ABTS**

La solución del radical catión ABTS<sup>+</sup> sólo es estable durante máximo dos días; por tal razón, se preparaban 5 ml de solución para cada ensayo y se ajustaba la absorbancia a  $0.7 \pm (0.02)$  diluyendo con etanol analítico a una longitud de onda de 732 nm. La actividad inhibidora del radical catión ABTS<sup>+</sup> se midió de acuerdo al método descrito por Re. [21]. Como control positivo se tomó una solución de hidroquinona (1000 µg/ml), como control negativo se usó el sistema de disolución correspondiente según cada caso. Como control positivo se tomó una solución de hidroquinona (1000 µg/ml), como control negativo se usó el sistema de disolución correspondiente según cada caso. Ambos controles se midieron siguiendo el

mismo protocolo. El ensayo se efectuó en un Espectrofotómetro Dynatech modelo MR580. Los equivalentes TROLOX se calcularon a partir la curva estándar y del porcentaje de actividad antioxidante obtenido para cada concentración de la muestra en prueba.

## **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES**

### ***1. Determinación de la actividad de la glutatión peroxidasa***

La actividad de la enzima glutatión peroxidasa se determinó por espectrofotometría con el método de Paglia y Valentine [22] utilizando un kit comercial de BioAssay Systems, EUA (EnzyChrom™ Glutathione Peroxidase Assay Kit (EGPX-100)). Se incubó una muestra de suero (50 µl) a temperatura ambiente con 800 µl de solución amortiguadora de ensayo (Tris-HCl 50 mM; EDTA 0.5 mM; pH 8) y 50 µl de solución de NADPH; se inició la reacción con 10 µl de ter-butil hidroperóxido (30 mM). La reacción fue seguida por 90 seg a una longitud de onda de 340 nm y se calculó la actividad de la enzima con el estándar de actividad incluido en el equipo. La cantidad de proteína total en las muestras de suero se determinó con el procedimiento de Lowry [23] usando albúmina sérica bovina como estándar. Las unidades se expresaron como U/mg de proteína.

### ***2. Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa***

La actividad de la enzima superóxido dismutasa se llevó a cabo de conformidad con el método de Bannister [24] usando un generador de radicales superóxido a partir de la reacción de la xantina con xantina oxidasa, detectando la inhibición de

la reacción por medio de la formación de formazan a partir del compuesto cloruro de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio (INT). Utilizando el kit comercial EnzyChrom™ Superoxide Dismutase Assay Kit (ESOD-100) (Bioassay Systems, EUA). A una muestra de suero (10 µl) se le agregaron 200 µl de solución de reacción (Tris-HCl 50 mM; sal de tetrazolium 0.1 mM; pH 8) y 20 µL de xantina oxidasa (incluida en el equipo). La muestra se incubó 20 minutos a temperatura ambiente y fue leída a 450 nm en un lector de ELISA; se obtuvo la actividad de la enzima mediante una curva de calibración de actividad enzimática incluida en el equipo. Bajo estas condiciones, una unidad de actividad de SOD se considera como la cantidad de enzima que inhibe 50% de la formación de formazan, tomando en cuenta una curva testigo con SOD pura. La curva testigo fue realizada bajo las mismas condiciones ya descritas, pero usando SOD de eritrocitos de bovino (20 U/l; Sigma Chemical St. Louis, EUA) en lugar de las muestras experimentales y expresando la actividad como U/mg de proteína.

#### **DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL-ALFA (TNF-A)**

La cantidad de TNFα, en suero se midió por ELISA utilizando un kit DuoSet1 (R & D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La concentración de cada citocina se determinó usando una curva estándar generada por 2 diluciones seriadas de la citocina recombinante. Se midieron los valores de absorbancia a 450 nm usando un espectrofotómetro Multiskan RC (ThermoLabsystems, Altrincham, Cheshire, Reino Unido)[25].



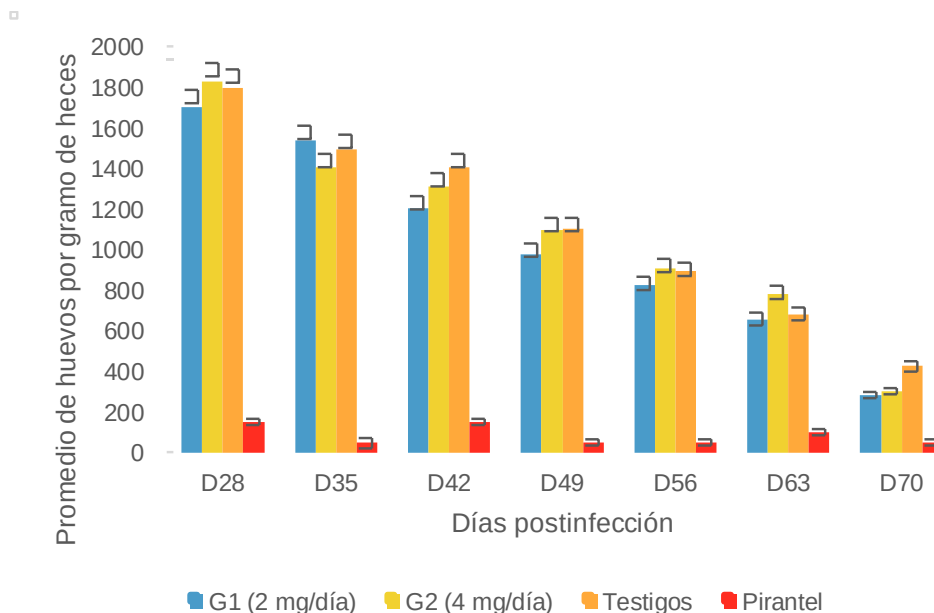
## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como medias  $\pm$  D.E. El análisis estadístico se efectuó con el programa SPSS. Se calculó la diferencia de medias entre grupos usando ANDEVA; para todos los casos una  $P < 0.05$  se consideró estadísticamente significativa.

## RESULTADOS

### *Coprología*

No se observó diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre la carga parasitaria determinada en los gatos que ingirieron la L-glutamina en relación con el grupo testigo. No obstante, los gatos tratados con pirantel no excretaron huevos de *Toxocara canis* a partir del día 28 post-infección. (Figura 7)



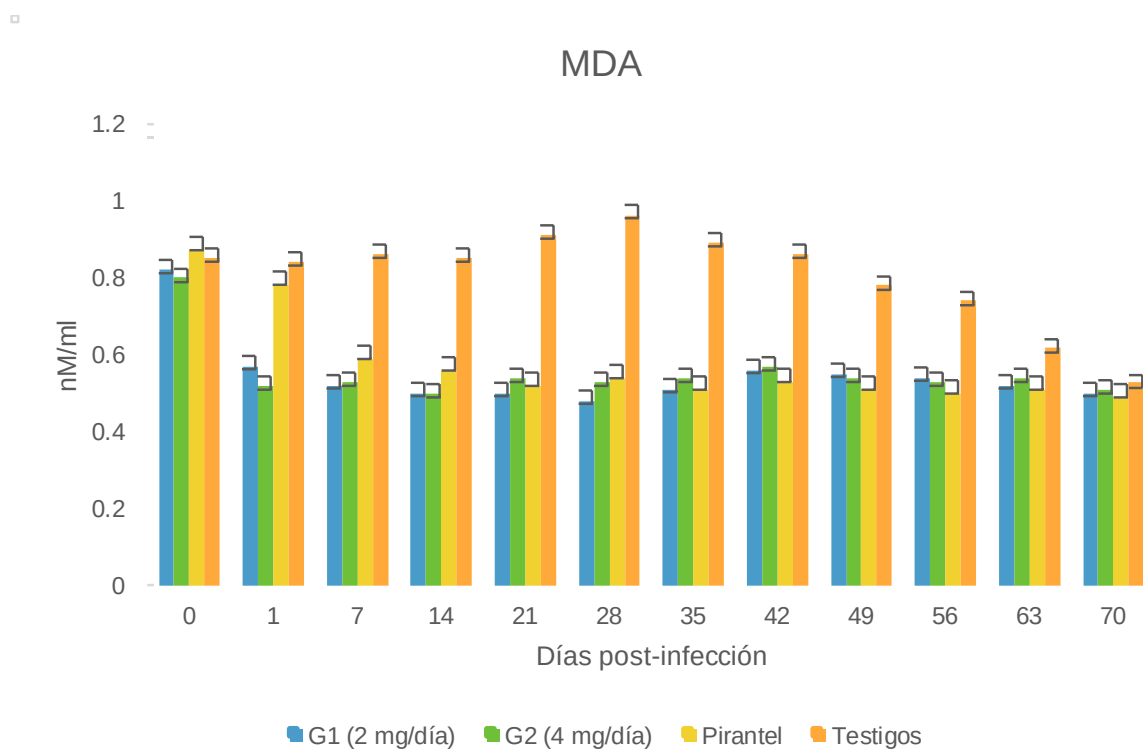
**Figura 7. Excreción de huevos de *Toxocara cati* en gatos infectados experimentalmente y complementados o no con L-glutamina.**

| COPROLOGIA (X±EE) |                |                |                |              |
|-------------------|----------------|----------------|----------------|--------------|
| Días              | G1 (2 mg/día)  | G2 (4 mg/día)  | Testigos       | Pirantel     |
| 21                | 1701.32±127.76 | 1827.38±66.83  | 1798.13±120.25 | 150.25±51.85 |
| 28                | 1682.54±88.57  | 1623.12±42.52  | 1719.09±111.51 | 250±26.73    |
| 35                | 1535.4±73.38   | 1402.86±107.43 | 1493.68±111.56 | 50.5±45.35   |
| 42                | 1201.35±132.26 | 1309.47±94.2   | 1402.82±96.24  | 150±13.60    |
| 49                | 978.73±72.15   | 1099.18±84.56  | 1100.38±71.21  | 50±23.98     |
| 56                | 825.5±82.08    | 910.06±64.58   | 892.18±44.84   | 50±20        |
| 63                | 656.25±70.23   | 782.77±57.27   | 680.6±46.37    | 100.25±26.35 |
| 70                | 283.88±35.98   | 300.43±33.75   | 429.46±42.39   | 50±20.16     |

Cuadro 1: coprología (X±EE)

### **Determinación de malondialdehído (MDA)**

Como se muestra en la figura 8, la adición de L-glutamina a la dieta de los gatos evitó la peroxidación lipídica al comparar los resultados con el grupo testigo que no ingirió el complemento nutricional. No observó diferencia significativa entre ambas dosis ( $P<0.05$ ).



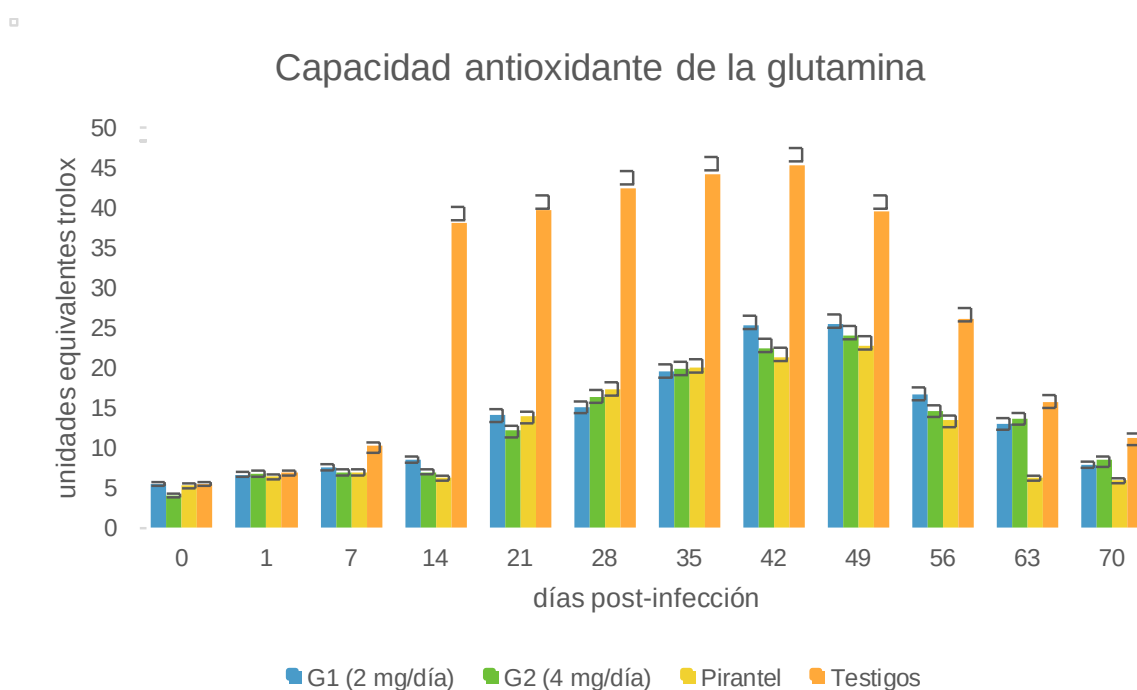
**Figura 8. Generación de malondialdehído en gatos infectados experimentalmente con *Toxocara cati* y complementados o no con L-glutamina y desparasitados o no**

| MDA (X±EE) |               |               |           |           |
|------------|---------------|---------------|-----------|-----------|
| Días       | G1 (2 mg/día) | G2 (4 mg/día) | Pirantel  | Testigos  |
| 0          | 0.82±0.03     | 0.8±0.01      | 0.87±0.05 | 0.85±0.22 |
| 1          | 0.57±0.07     | 0.52±0.12     | 0.78±0.03 | 0.84±0.26 |
| 7          | 0.52±0.03     | 0.53±0.02     | 0.59±0.13 | 0.86±0.14 |
| 14         | 0.5±0.09      | 0.5±0.09      | 0.56±0.02 | 0.85±0.15 |
| 21         | 0.5±0.09      | 0.54±0.14     | 0.52±0.13 | 0.91±0.23 |
| 28         | 0.48±0.07     | 0.53±0.05     | 0.54±0.04 | 0.96±0.14 |
| 35         | 0.51±0.08     | 0.54±0.04     | 0.51±0.12 | 0.89±0.29 |
| 42         | 0.56±0.13     | 0.57±0.13     | 0.53±0.03 | 0.86±0.23 |
| 49         | 0.55±0.06     | 0.54±0.11     | 0.51±0.13 | 0.78±0.25 |
| 56         | 0.54±0.1      | 0.53±0.03     | 0.5±0.14  | 0.74±0.19 |
| 63         | 0.52±0.02     | 0.54±0.06     | 0.51±0.11 | 0.62±0.08 |
| 70         | 0.5±0.06      | 0.51±0.06     | 0.49±0.07 | 0.53±0.13 |

**Cuadro 2:: MDA (X±EE)**

## **Capacidad antioxidante de la L-glutamina en suero de gatos infectados con *T. cati***

Las muestras sanguíneas de los gatos que ingirieron L-glutamina en la dieta mostraron mayor ( $P<0.05$ ) actividad captadora del radical ABTS+ en contraste con el grupo testigo a partir del día 14 post-infección. Asimismo, se observó una diferencia significativa en los datos obtenidos con el grupo que ingirió 4 mg por día con respecto al grupo que ingirió 2 mg, ya que en el primer caso la actividad antioxidante del aminoácido fue mayor a partir del día 21 post-infección (Figura 9).



**Figura 9. Captación del radical ABTS+ en gatos infectados experimentalmente con *Toxocara cati* y complementados o no con L-glutamina.**

| TROLOX (X±EE) |               |               |            |            |
|---------------|---------------|---------------|------------|------------|
| Días          | G1 (2 mg/día) | G2 (4 mg/día) | Pirantel   | Testigos   |
| 0             | 5.42±0.88     | 4.01±1.07     | 5.23±0.3   | 5.42±6.09  |
| 1             | 6.62±0.79     | 6.74±1.1      | 6.38±0.84  | 6.82±7.1   |
| 7             | 7.53±0.92     | 6.87±0.27     | 6.89±1.08  | 10.2±5.66  |
| 14            | 8.47±0.36     | 6.96±0.15     | 6.17±0.35  | 38.13±5.81 |
| 21            | 14.07±0.57    | 12.15±0.61    | 13.87±0.69 | 39.6±6.18  |
| 28            | 15.06±1       | 16.39±0.15    | 17.24±0.98 | 42.36±5.94 |
| 35            | 19.48±0.16    | 19.8±0.96     | 20.02±1.04 | 44.14±6.51 |
| 42            | 25.25±0.25    | 22.47±0.79    | 21.34±0.64 | 45.21±6.98 |
| 49            | 25.38±0.57    | 24.01±0.26    | 22.76±0.24 | 39.54±6.22 |
| 56            | 16.65±1.07    | 14.63±0.40    | 13.4±0.26  | 26.12±6.54 |
| 63            | 12.97±0.61    | 13.67±1.07    | 6.23±0.4   | 15.73±6.87 |
| 70            | 7.92±0.43     | 8.42±0.81     | 5.88±1.1   | 11.16±6.56 |

Cuadro 3: Trolox (X±EE)

### **Determinación de la actividad de la glutatión peroxidasa**

El análisis de los datos que se ilustran en la figura 10 permite afirmar que la actividad de la enzima glutatión peroxidasa fue significativamente mayor en los grupos que ingirieron 2 mg y 4 mg de L-glutamina en contraste con los testigos no tratados e incluso con el grupo que consumió la dosis oral de pamoato de pirantel. Con excepción de los días 42 y 49, no se presentó diferencia significativa entre ambas dosis. En estos dos puntos de la escala de tiempo del estudio, la dosis de 4 mg produjo una mayor ( $P<0.05$ ) actividad antioxidante que la de 2 mg. En el caso del grupo que fue dosificado con pirantel, se observó un aumento significativo en los niveles de glutatión peroxidasa del día 28 al 49 postinfección. En todos los casos, la actividad de la enzima regresó a los niveles previos a la dosificación a partir del día 56 postinfección.

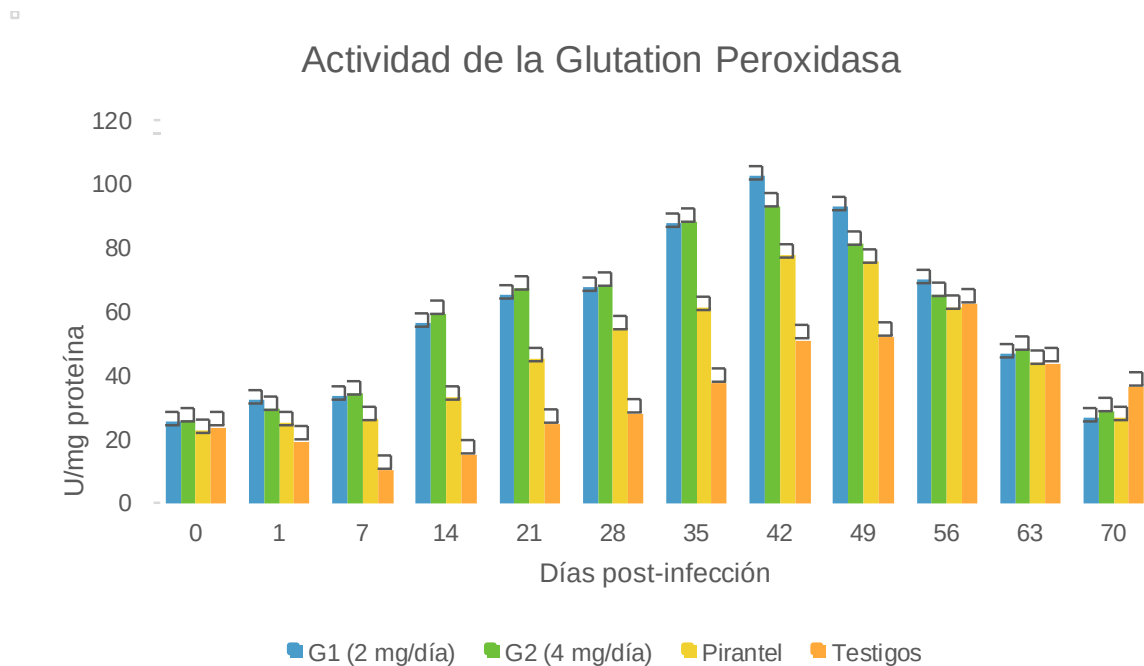


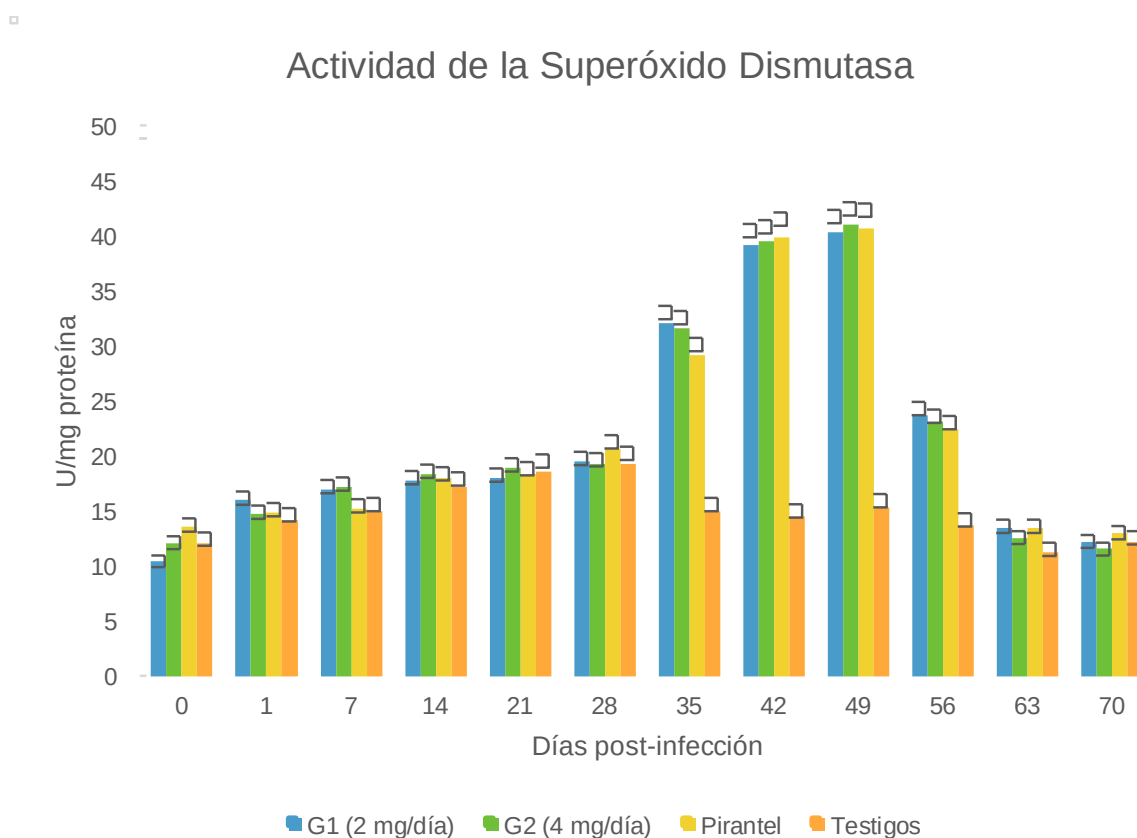
Figura 10. Actividad de la enzima glutatión peroxidasa en gatos infectados experimentalmente con *Toxocara cati* y complementados o no con L-glutamina.

| GLUTATION PEROXIDASA (X±EE) |               |               |            |            |
|-----------------------------|---------------|---------------|------------|------------|
| Días                        | G1 (2 mg/día) | G2 (4 mg/día) | Pirantel   | Testigos   |
| 0                           | 25.54±6.02    | 25.8±4.28     | 22.69±8.07 | 23.63±9.16 |
| 1                           | 32.26±6.19    | 29.31±5.81    | 24.97±7.2  | 19.26±8.16 |
| 7                           | 33.47±4.61    | 34.28±5.85    | 26.48±9.02 | 10.13±8.76 |
| 14                          | 56.56±7.97    | 59.32±5.69    | 33.03±6.95 | 15.01±6.49 |
| 21                          | 65.3±9.15     | 67.16±3.84    | 45.16±7.74 | 24.7±6.58  |
| 28                          | 67.54±4       | 68.14±6.57    | 54.94±7.27 | 27.7±8.76  |
| 35                          | 87.81±9       | 88.12±5.30    | 61.31±7.13 | 37.64±7.91 |
| 42                          | 102.52±4.55   | 93.02±6.06    | 77.66±8.69 | 50.93±6.70 |
| 49                          | 92.96±4.13    | 81.21±3.89    | 75.79±8.49 | 51.85±8.32 |
| 56                          | 70±8.54       | 65.05±7.02    | 61.36±7.32 | 62.44±9.19 |
| 63                          | 46.7±5.58     | 48.04±3.49    | 44.06±8.66 | 43.71±8.95 |
| 70                          | 26.88±5.25    | 28.76±9.22    | 26.69±8.81 | 36.24±6.56 |

Cuadro 4: Glutation Peroxidasa (X±EE)

### Determinación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD)

En la figura 11 se presentan gráficamente los resultados sobre la actividad de la enzima superóxido dismutasa para los grupos en estudio. Los gatos que ingirieron tanto 2 mg como 4 mg de L-glutamina presentaron una actividad de SOD significativamente superior a los testigos y tratados con pirantel ( $P < 0.05$ ) del día 7 al 63 postinfección. La actividad de la enzima fue significativamente mayor en los gatos tratados con pirantel los días 35, 42 y 49 postinfección con un nivel de significancia inferior a 0.05.



**Figura 11. Actividad de la enzima glutatión peroxidasa en gatos infectados experimentalmente con *Toxocara cati* y complementados o no con L-glutamina.**

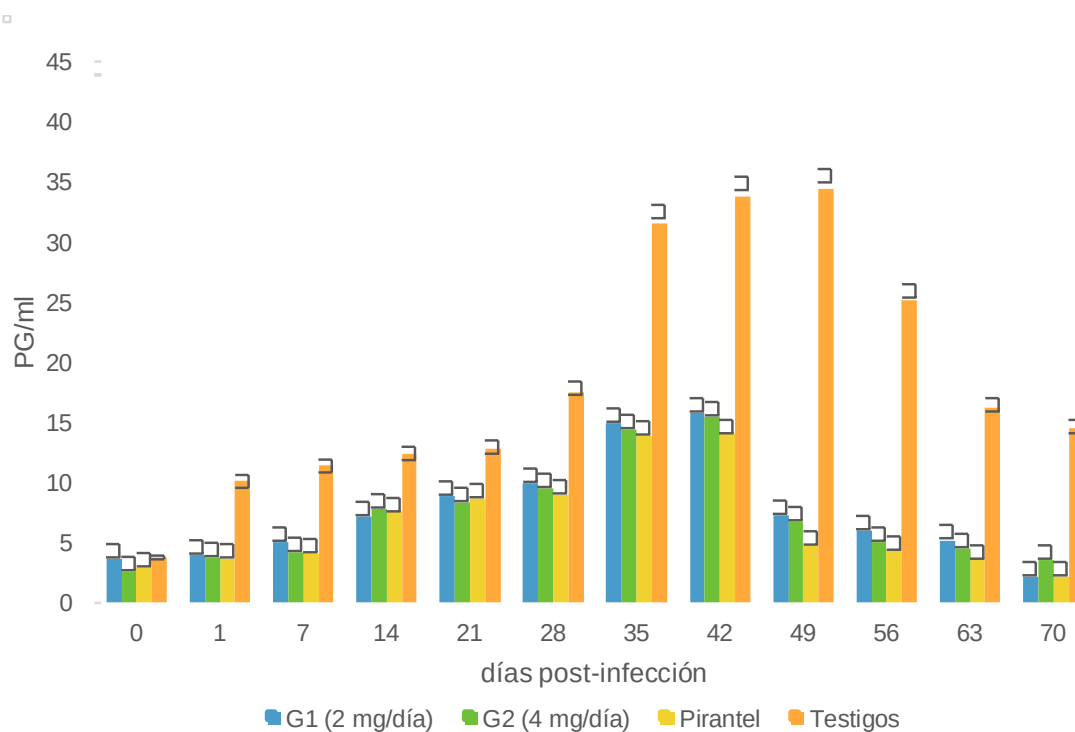
| SUPEROXIDO DISMUTASA (X±EE) |               |               |            |            |
|-----------------------------|---------------|---------------|------------|------------|
| Días                        | G1 (2 mg/día) | G2 (4 mg/día) | Pirantel   | Testigos   |
| 0                           | 10.45±3.63    | 12.11±3.89    | 13.58±6.66 | 12.07±4.79 |
| 1                           | 15.98±6.08    | 14.71±4.22    | 14.87±4.88 | 14.14±4.43 |
| 7                           | 16.93±4.41    | 17.14±5.49    | 15.25±4.61 | 14.98±3.93 |
| 14                          | 17.76±6.75    | 18.35±4.13    | 17.97±3.79 | 17.15±6.05 |
| 21                          | 18±3.26       | 18.87±6.54    | 18.38±3.44 | 18.56±5.08 |
| 28                          | 19.46±3.92    | 19.25±3.96    | 20.7±4.65  | 19.26±5.23 |
| 35                          | 32.08±4.82    | 31.59±6.44    | 29.14±4.62 | 14.91±4.76 |
| 42                          | 39.17±6.66    | 39.47±5.62    | 39.92±5.15 | 14.45±4.05 |
| 49                          | 40.38±5.80    | 41.03±4.32    | 40.7±5.49  | 15.26±5.06 |
| 56                          | 23.71±4.15    | 23.09±5.38    | 22.45±5.67 | 13.64±5.43 |
| 63                          | 13.51±3.80    | 12.53±5.70    | 13.5±4.63  | 11.21±4.32 |
| 70                          | 12.18±5.39    | 11.57±6.10    | 12.94±6.09 | 12.2±5.80  |

Cuadro 5: Superoxido Dismutasa (X±EE)

#### **DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIONES SÉRICAS DE TNF-A**

En contraste con el grupo testigo, los niveles de TNF- $\alpha$  fueron significativamente menores en los grupos que consumieron la dieta complementada con L-glutamina a lo largo del estudio. Con respecto a los gatos tratados con pirantel, los niveles de esta citocina fueron mayores desde el inicio del estudio hasta el día 28 postinfección y complementación nutricional (día 3 postratamiento con pirantel). No se observó una diferencia estadísticamente significativa entre ambas dosis probadas de L-glutamina (Figura 12).





**Figura 12. Niveles de TNF-  $\alpha$  en gatos infectados experimentalmente con *Toxocara cati* y complementados o no con L-glutamina.**

| TNF-ALFA (X $\pm$ EE) |                  |                  |                  |                   |
|-----------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| Días                  | G1 (2 mg/día)    | G2 (4 mg/día)    | Pirantel         | Testigos          |
| 0                     | 3.65 $\pm$ 1.99  | 2.64 $\pm$ 2.33  | 2.91 $\pm$ 2.64  | 3.75 $\pm$ 2.25   |
| 1                     | 3.93 $\pm$ 1.37  | 3.79 $\pm$ 1.32  | 3.68 $\pm$ 3.19  | 10.13 $\pm$ 2.29  |
| 7                     | 5.02 $\pm$ 1.57  | 4.23 $\pm$ 3.20  | 4.08 $\pm$ 2.06  | 11.38 $\pm$ 1.49  |
| 14                    | 7.17 $\pm$ 2.45  | 7.83 $\pm$ 0.84  | 7.56 $\pm$ 2.62  | 12.36 $\pm$ 1.61  |
| 21                    | 8.9 $\pm$ 2.38   | 8.37 $\pm$ 0.93  | 8.68 $\pm$ 3.16  | 12.84 $\pm$ 2.24  |
| 28                    | 9.92 $\pm$ 2.50  | 9.49 $\pm$ 1.45  | 9.03 $\pm$ 1.73  | 17.52 $\pm$ 0.88  |
| 35                    | 14.93 $\pm$ 1.35 | 14.42 $\pm$ 2.48 | 13.89 $\pm$ 2.93 | 31.49 $\pm$ 8.41  |
| 42                    | 15.83 $\pm$ 1.17 | 15.44 $\pm$ 4.48 | 14.06 $\pm$ 1.42 | 33.75 $\pm$ 10.26 |
| 49                    | 7.27 $\pm$ 3.10  | 6.73 $\pm$ 2.68  | 4.75 $\pm$ 3.03  | 34.38 $\pm$ 1.60  |
| 56                    | 6.01 $\pm$ 1.15  | 5.08 $\pm$ 1.76  | 4.38 $\pm$ 3     | 25.2 $\pm$ 2.90   |
| 63                    | 5.19 $\pm$ 3.17  | 4.54 $\pm$ 2.33  | 3.62 $\pm$ 1.19  | 16.25 $\pm$ 2.69  |
| 70                    | 2.15 $\pm$ 1.07  | 3.52 $\pm$ 1.31  | 2.17 $\pm$ 2.47  | 14.47 $\pm$ 1.86  |

**Cuadro 6: TNF-ALFA (X $\pm$ EE)**

## DISCUSIÓN

La inflamación intestinal representa una respuesta defensiva fundamental del organismo para contrarrestar una infección y daño tisular, lo cual tiene por objeto restaurar la homeostasis [26]. En la mucosa intestinal de gatos infectados con *Toxocara cati*, se desconocen los procesos que determinan el inicio de una respuesta inflamatoria en las células de la lámina propia hasta donde se tiene conocimiento. Sin embargo, el conocimiento de estos procesos podría ayudar a entender los principios básicos del inicio de una respuesta inmune intestinal y adicionalmente podría promover la identificación de blancos farmacológicos que permitan modular las respuestas inmunopatológicas que predisponen a estados crónicos de inflamación cuando un animal está constantemente expuesto a cargas parasitarias elevadas y además se encuentra inmunocomprometido. El estudio de los procesos de estrés oxidativo la determinación de la secreción de una de las citocinas inflamatorias más importantes (TNF- $\alpha$ ) que se propuso con este trabajo puede proveer la base para continuar con investigaciones sobre las alteraciones relevantes relacionadas con la respuesta inflamatoria intestinal en gatos infectados con *Toxocara cati* [25].

Con relación al estrés oxidativo, en este trabajo se observó que en curso de una infección causada por *T. cati* en el hospedero felino se presenta un aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los animales infectados, ya que el nivel de malondialdehído fue significativamente mayor en los animales infectados que no recibieron la L-glutamina. Asimismo, la captación del radical ABTS+ fue significativamente inferior en este mismo grupo de gatos. De la misma

manera, la actividad de las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa fueron significativamente superiores en los animales que recibieron las dos dosis experimentales de L-glutamina. Este resultado concuerda parcialmente con los hallazgos documentados [27], ya que estos autores reportaron un aumento en la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa en búfalos infectados con el parásito *Toxocara vitulorum* y un aumento en los niveles de MDA. Se sugiere que la diferencia en los resultados referentes a las dos enzimas antioxidantes podría explicarse por el hecho de que en el estudio mencionado los autores identificaron nematodos, cestodos, trematodos y protozoarios, entre ellos *Eimeria* spp. Este género de coccidia induce una respuesta inmune diferente a la que se presenta durante una helmintiasis, pues en la coccidiosis bovina aumenta la circulación de macrófagos que producen niveles elevados de ROS y es predominante una respuesta celular tipo Th1 [28]; a diferencia de una infección por helmintos en la que la respuesta inmune está asociada con el desarrollo de linfocitos T cooperadores de tipo 2 (Th2), con presencia de eosinofilia, basofilia, niveles elevados de IgE y metaplasia celular del epitelio de la mucosa; además, aparecen macrófagos alternativamente activados en los tejidos afectados [29]. La formación de especies reactivas de oxígeno como resultado de un desequilibrio entre el sistema oxidante/antioxidante y su reactividad hacia numerosos objetivos moleculares lleva a un daño oxidativo que contribuye a diferentes patologías [30]. Las consecuencias de ésta inapropiada producción de ROS son más perjudiciales en aquellos casos donde los niveles de las moléculas antioxidantes están disminuidos.

En el presente trabajo, la adición de L-glutamina a la dieta contribuyó significativamente al aumento de la captación de radicales relacionados con el estrés oxidativo y redujo la peroxidación lipídica de acuerdo con los resultados del ensayo de MDA. Además aumentaron las actividades de las dos enzimas antioxidantes estudiadas [31]. La disminución de MDA y aumento de las enzimas concuerda con estudios previos en los que se ha comprobado un incremento de los niveles de glutatión unido a la disminución del MDA y actividad aumentada de enzimas antioxidantes [32]. No obstante, estos estudios se llevaron a cabo en modelos murinos y no felinos.

Se ha propuesto que la deficiencia del sistema glutatión es una causa relevante de la susceptibilidad al daño tisular mediado por los radicales libres. Sin embargo, se ha demostrado que es posible lograr una protección contra la toxicidad oxidativa incrementando los niveles celulares de glutatión [33].

La regulación de la concentración de glutatión involucra la liberación de sus precursores desde el tejido periférico hasta el interior de la célula para la síntesis de novo y transporte al plasma [34].

Estudios anteriores al presente trabajo han demostrado que de administración de una dieta complementada con glutamina protege al organismo del daño originado por los radicales libres, efecto que probablemente se deba al mantenimiento de los niveles de glutatión y una mejor capacidad antioxidante [35]. Asimismo, los estudios clínicos en humanos han demostrado una reducción de la mortalidad al incorporar glutamina en la nutrición parenteral en pacientes críticos .

Es relevante mencionar que la función antioxidante de la L-glutamina en gatos no ha sido documentada hasta donde se tiene conocimiento al concluir este trabajo, ya que a la fecha solamente se han explorado el papel de la vitamina E y el selenio como complementos nutricionales antioxidantes en esta especie animal [36]. Asimismo, no existe evidencia de estudios realizados en gatos infectados con *T. cati* que hayan recibido un complemento de L-glutamina para estudiar su efecto sobre la patología intestinal provocada por este nematodo.

A pesar de que en nuestro estudio la complementación con L-glutamina no mostró efectos sobre la carga parasitaria, se presentó una disminución en la concentración de la citocina inflamatoria TNF- $\alpha$ . El TNF- $\alpha$ , una potente citocina pleiotrópica con múltiples funciones celulares, se ha relacionado de manera crítica con la patogénesis de diversas enfermedades crónicas inflamatorias [37]. El TNF- $\alpha$  regula diversos eventos biológicos fundamentales de las células, tales como la activación de los leucocitos, la liberación de diversas citocinas y quimiocinas, y la producción de ROS e intermediarios de nitrógeno. Se ha observado que tanto la forma sTNF- $\alpha$  como la unida a membrana pueden ejercer un papel biológico inflamatorio; la unida a membrana lo hace de manera local y depende de la interacción entre células (se ha reportado que puede funcionar como ligando y receptor en los procesos inflamatorios), mientras que el sTNF- $\alpha$  ejerce sus funciones a distancia de las células que lo sintetizan [38].

Los resultados obtenidos al administrar un complemento de L-glutamina experimentalmente demostraron que la secreción de TNF- $\alpha$  disminuyó significativamente en los gatos que ingirieron 2 mg ó 4 mg de L-glutamina. La falta

de diferencia en la respuesta de los gatos al doble de la dosis permite especular que la L-glutamina administrada a 2 mg/kg alcanza los niveles plasmáticos necesarios para inhibir la generación de TNF- $\alpha$ . Estos resultados sugieren que en vista de la agresión mecánica y traumática ejercida por los helmintos, la respuesta metabólica es intensa y condiciona un riesgo nutricional de depleción de glutamina en el organismo. Al adicionarla a la dieta, aumenta su capacidad antioxidante y por consiguiente se reduce el daño tisular y la respuesta inflamatoria. Las investigaciones recientes que resaltan la inmunomodulación han revelado un papel notable del aminoácido L-glutamina en los pacientes críticamente enfermos. Por ejemplo, se ha hecho énfasis en que la L-glutamina está involucrada esencialmente en el transporte de nitrógeno entre órganos, mecanismos celulares redox y en la producción de nucleótidos, glucosa y glutatión . Sin embargo, en la enfermedad crítica aparentemente su demanda se incrementa y los niveles plasmáticos disminuyen [39]. En consecuencia, la administración de glutamina durante la inflamación conlleva a una respuesta inmune mejorada, regeneración más pronta y a una ausencia de efectos tóxicos. Asimismo, se ha demostrado que la administración externa de glutamina resulta en una reducción de neumonía, superinfecciones bacterianas y sepsis severa [40].

## **CONCLUSIONES**

Mediante la realización de este experimento se pudo demostrar que el nutraceutico utilizado ejerció un efecto antioxidante durante el curso de una infección experimental a causa de *Toxocara cati*. Este tipo de ensayos *in vivo*, abre las puertas para continuar con el proceso de investigación en materia de nutraceuticos y de este modo, explicar de una manera más tangible los mecanismos por los cuales los productos nutricionales pueden coadyuvar o empeorar las enfermedades de tipo infeccioso.

## **RECOMENDACIONES**

Para futuros ensayos sería apropiado evaluar la respuesta al estrés oxidativo en una mayor población y determinar la activación de células anti-inflamatorias, pro-inflamatorias, inflamatorias y reguladoras tanto *in vivo* como *in vitro*.

## BIBLIOGRAFIA

1. Echeverry, D.M., M.I. Giraldo, and J.C. Castaño, *Prevalencia de helmintos intestinales en gatos domésticos del departamento del Quindío, Colombia*. Biomédica, 2012. 32(3): p. 430-436.
2. Canto, G.J., et al., *Prevalence of fleas and gastrointestinal parasites in free-roaming cats in central Mexico*. PLoS One, 2013. 8(4): p. 744.
3. Méndez, B.J., et al., *Toxocariasis: evidencias de una enfermedad ignorada por los clínicos y los laboratorios*. Revista de investigación clínica, 2012. 64(2): p. 207-208.
4. Martinez-Barbabosa, I., et al., *The prevalence of Toxocara cati in domestic cats in Mexico City* Veterinary Parasitology, 2003. 114(1): p. 43-49.
5. Alba Hurtado, F. and M.A. Muñoz Guzman, *Ascariosis*, in *Parasitología Veterinaria*, V.F. Ibarra, C.J.A. Figueroa, and R.J. Quiroz, Editors. 2011, México: Color S.A. : México.
6. Strube, C., L. Heuer, and E. Janecek, *Toxocara spp. infections in paratenic hosts*. Veterinary Parasitology, 2013. 193(4): p. 375-389.
7. Rus-Rus, M.-C., *Estudio de los elementos parasitarios presentes en heces de carnívoros domésticos en la ciudad de Jaén*. Universidad de Jaén. Facultad de Ciencias Experimentales, 2014.
8. Takahashi, Y., *Antigens of trichinella spiralis*. Parasitology Today, 1997. 13(3): p. 104-6.
9. Flisser, A., *Inmunomodulación intestinal por helmintos: un tema de actualidad*. Biomédica 2011. 31(Sup. 3): p. 237-239



10. Kennedy, M.A., *A brief review of the basics of immunology: the innate and adaptive response*. Veterinary Clinics: Small Animal Practice 2010. 40(3): p. 369-379.
11. Lin, E., J.G. Kotani, and S.F. Lowry, *Nutritional modulation of immunity and the inflammatory response*. Nutrition. 14(6): p. 545-550.
12. Anaya, R., H. Arenas, and D. Arenas, *Nutrición enteral y parenteral*. Segunda Edición ed. 2012, México: Mc Graw Hill.
13. Wilmore, D.W. and J.K. Shabert, *Role of glutamine in immunologic responses*. Nutrition, 1998. 14(7-8): p. 618-26.
14. Roth, E., et al., *Regulative potential of glutamine--relation to glutathione metabolism*. Nutrition, 2002. 18(3): p. 217-21.
15. Mondello, S., et al., *Glutamine-supplemented total parenteral nutrition improves immunological status in anorectic patients*. Nutrition, 2010. 26(6): p. 677-81.
16. National Institutes of Health U.S.A. *Guía Para el Cuidado y Uso de Los Animales de Laboratorio*. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health U.S.A. Edición Mexicana Auspiciada por la Academia Nacional de Medicina. México, D.F. 2002.
17. Del Río, V.H., *Interacciones Neuroinmunoendocrinas durante la toxocariosis por Toxocara canis: el papel de la prolactina*, in Instituto de Investigaciones Biomédicas. 2015, Universidad Nacional Autónoma de México: México.
18. Besné, M.A., et al., *Manual de Prácticas de Laboratorio de Parasitología* 2005.

19. Draper, H.H., et al., *A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials*. Free Radical Biology and Medicine, 1993. 15(4): p. 353-363.
20. Kuskoski, E.M., et al., *Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos*. Food Science and Technology (Campinas), 2004. 24: p. 691-693.
21. Re, R., et al., *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free Radic Biol Med, 1999. 26(9-10): p. 1231-7.
22. Paglia, D.E. and W.N. Valentine, *Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase*. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 70(1): p. 158-169.
23. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. 193(1): p. 265-75.
24. Bannister, J.V., W.H. Bannister, and G. Rotilio, *Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase*. CRC Crit Rev Biochem, 1987. 22(2): p. 111-80.
25. Cambier, L., et al., *Feline polymorphonuclear neutrophils produce pro-inflammatory cytokines following exposure to Microsporum canis*. Veterinary microbiology, 2013. 162(2): p. 800-805.
26. Medzhitov, R., *Origin and physiological roles of inflammation*. Nature, 2008. 454(7203): p. 428-35.
27. El-Sangary, F.M., et al., *Effect of internal parasitic infestation on antioxidant enzymes in buffalo-calves*. Egyptian Journal of Agricultural Research, 2010. 88(2): p. 587-596.

28. Taubert, A., et al., *Monocyte- and macrophage-mediated immune reactions against Eimeria bovis*. Veterinary Parasitology, 2009. 164(2-4): p. 141-153.
29. Fisher, M., *Toxocara cati: an underestimated zoonotic agent*. Trends in Parasitology, 2003. 19(4): p. 167-170.
30. Ferrari, C.K.B., *Free radicals, lipid peroxidation and antioxidants in apoptosis: implications in cancer, cardiovascular and neurological diseases*. Biologia, 2000. 55(6): p. 581-590.
31. Abilés, J., et al., *Efectos de la suplementación con glutamina sobre el sistema antioxidante y la peroxidación lipídica en pacientes críticos con nutrición paraenteral*. Nutricion Hospitalaria, 2008. 23(4): p. 332-339.
32. Batcioglu, K., et al., *Comparison of chemopreventive effects of Vitamin E plus selenium versus melatonin in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mouse brain damage*. Cancer Detection and Prevention, 2002. 29(1): p. 54-58.
33. Flaring, U.B., et al., *Glutamine attenuates post-traumatic glutathione depletion in human muscle*. Clinical Science, 2003. 104(3): p. 275-82.
34. Kretzschmar, M., et al., *Glutathione homeostasis and turnover in the totally hepatectomized rat: evidence for a high glutathione export capacity of extrahepatic tissues*. Experimental and Toxicologic Pathology, 1992. 44(5): p. 273-281.
35. Ziegler, T.R., *Glutamine supplementation in bone marrow transplantation*. British Journal of Nutrition, 2002. 87 Suppl 1: p. S9-15.

36. Zicker, S.C., K.J. Wedekind, and D.E. Jewell, *Antioxidants in veterinary nutrition*. Veterinary Clinics: Small Animal Practice, 2006. 36(6): p. 1183-98, v.
37. Aggarwal, B.B., S.C. Gupta, and J.H. Kim, *Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey*. Blood, 2012. 119(3): p. 651-65.
38. Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich, *Tumor necrosis factor signaling*. Cell Death Differ, 2003. 10(1): p. 45-65.
39. Griffiths, R.D., C. Jones, and T.E. Palmer, *Six-month outcome of critically ill patients given glutamine-supplemented parenteral nutrition*. Nutrition, 1997. 13(4): p. 295-302.
40. Wernerman, J., *Glutamine and acute illness*. Current Opinion Critical Care, 2003. 9(4): p. 279-85.

