

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



TESIS

**EFECTO DE LA MIGRACIÓN A CEREBRO DE *Toxocara canis* EN LA
EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON APOPTOSIS EN UN
MODELO MURINO**

QUE PRESENTA

MVZ. ANDREA GONZÁLEZ BÁEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

NOVIEMBRE, 2015

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
POSGRADO CONJUNTO**



TESIS

**EFECTO DE LA MIGRACIÓN A CEREBRO DE *Toxocara canis* EN LA
EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON APOPTOSIS EN UN
MODELO MURINO**

QUE PRESENTA

MVZ. ANDREA GONZÁLEZ BÁEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO

NOVIEMBRE, 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
POSGRADO CONJUNTO AGRONOMIA - VETERINARIA



EFFECTO DE LA MIGRACIÓN A CEREBRO DE *Toxocara canis* EN LA
EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON APOPTOSIS EN UN MODELO
MURINO

Aprobación de tesis por el comité particular de

MVZ. Andrea González Báez

Dr. Juan José Zárate Ramos

Director de Tesis

Dra. Diana Elisa Zamora Ávila

Co- Director

Dr. Pablo Zapata Benavides

Co- Director

MC. Armando Trejo Chavez

Co-Director

ESCOBEDO, N.L. MÉXICO

NOVIEMBRE 2015

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Parasitología y el Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia bajo la dirección del Dr. Juan José Zárate Ramos.

DEDICATORIA

Este trabajo quisiera dedicarlo a Dios que me fortalece siempre y me demuestra que no me abandona en ningún momento y me rodea de enormes bendiciones a través de mi familia, esposo, amigos y compañeros de trabajo.

AGRADECIMIENTO

- En primer lugar quisiera agradecer a mi director de tesis el Dr. Juan José Zárate Ramos, por darme la oportunidad de aprender de él, por acercarme al mundo de la parasitología y por ser fuente de inspiración en mi forma de proceder, para él mi admiración total como profesionalista y persona que tiene la capacidad de equilibrar sus acciones en todas sus funciones y aún mantenerse leal a sus principios fomentando la pasión e integridad en todo lo que hace.
- Para mi co-directora la Dra. Diana E. Zamora Ávila, que no tengo las palabras para agradecer su apoyo incondicional y agradecer a Dios por permitirme rodearme de gente como ella, una persona con un corazón de oro y una mente objetiva que ha representado un apoyo profesional y emocional en todos los aspectos, a quien tengo el honor de llamar amiga.
- Para mi co-director el M.C. Armando Trejo Chávez que es ejemplo de amor por el trabajo, quien no tiene limitaciones para trabajar y que siempre trabaja dentro de un marco ético y lleno de valores, agradecida de su tiempo y las pláticas entrañables que me brindó.
- Para mi co-director el Dr. Pablo Zapata Benavides que a pesar de tener un tiempo muy limitado por sus grandes responsabilidades, siempre se dio el tiempo y tuvo la disposición de ayudar y aportar de manera muy asertiva, ejemplo de alguien que disfruta se trabajo sin importar nada y que siempre aporta su calidad de persona a todo lo que hace y eso hace que lo transmita a quien se rodea de él.
- Para mi familia que sin importar lo que pase permanecemos unidos de manera incondicional, mis padres son y serán siempre la imagen de lo que quiero ser, por ellos soy y quiero ser, a mis hermanos que me enseñan diariamente cosas nuevas, en todos ellos veo a Dios en mi vida, mi amor eterno para ellos.
- A mi esposo, Luis Cabral González, mi compañero de vida, que me enseña diariamente el amor de Dios en su actuar, que ha sido mi maestro y confidente, que representa un apoyo físico, mental, emocional y espiritual en

todo momento y que agradezco infinitamente su vida en la mía, pues ha representado para mí un crecer en todos los aspectos de mi vida, mi amor eterno para él también.

- Al Dr. Daniel González Spéncer, mi tío que es un integrante más de mi familia, y que gracias a él soy mucho de lo que soy ahora, mi admiración enorme por sus logros y su integridad, es y será siempre parte de nuestra familia.
- Por último a Dios por todo lo que me da diariamente, por permitirme rodearme de gente a la que tengo mucho que agradecer, y sobre todo con la presencia de ellos en mi vida me demuestra su enorme amor, para Él y por Él todo siempre.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	iv
ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN.....	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	4
3. OBJETIVOS.....	4
4. ANTECEDENTES.....	5
4.1 Generalidades de <i>Toxocara canis</i>	5
4.2 Ciclo biológico de <i>Toxocara canis</i>	8
4.3 Toxocariosis.....	11
4.3.1 Toxocariosis en hospederos definitivos.....	11
4.3.1.1 Caninos menores de 6 meses.....	11
4.3.1.2 Caninos mayores de 6 meses.....	12
4.3.2 Toxocariosis en hospederos paraténicos.....	12
4.3.3 Toxocariosis Humana.....	16
4.3.3.1. Clínica de la Toxocariosis.....	16
4.3.4 Diagnóstico.....	20
4.3.4.1 Diagnóstico en el hospedero definitivo.....	20
4.3.4.2 Diagnóstico en el hospedero paraténico y caninos mayores de 6 meses.....	20
4.3.5 Tratamiento.....	23
4.4 Epidemiología de <i>Toxocara canis</i>	23
4.5 Muerte celular.....	26

4.5.1 Apoptosis.....	27
4.5.2 Autofagia.....	30
4.5.3 Necrosis y necroptosis.....	31
4.5.4 Pyroptosis.....	31
4.6 Apoptosis y parásitos.....	32
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
5.1 Obtención de huevos embrionados.....	34
5.2 Establecimiento del modelo de neurotoxocariosis.....	35
5.3 Identificación de larvas migratorias en cerebro por medio del método de compresión tisular.....	36
5.4 Obtención de RNA total de tejido cerebral animal por medio de un sistema de extracción y purificación por columnas.....	37
5.5 Síntesis de ADN complementario (ADNc).....	38
5.6 PCR punto final para la identificación de <i>Toxocara canis</i> y análisis de la expresión del gen constitutivo B-actina y genes relacionados con la apoptosis (Bax, Bcl2, Bcl-XI, Bcl-Xs).....	39
5.7 Identificación de la fragmentación de ADN sobre el tejido por medio de la técnica de TUNEL.....	41
5.8 Análisis de la migración larvaria a cerebro por medio de histopatología.....	41
6. RESULTADOS.....	43
6.1 Obtención de huevos infecciosos de <i>T. canis</i> a partir de hembras adultas.....	43
6.2 Establecimiento de un modelo de neurotoxocariosis con huevos larvados de <i>Toxocara canis</i>	46
6.3 Identificación de larvas migratorias de <i>T. canis</i> por la técnica de compresión tisular.....	47

6.4 Amplificación del gen constitutivo b-actina e identificación molecular de <i>Toxocara canis</i>	50
6.5 Análisis de la alteración de genes apoptóticos en ratones con neurotoxocariosis.....	53
6.6 Determinación de apoptosis en tejido cerebral por medio de la técnica de TUNEL.....	57
6.7 Análisis de lesiones en cerebro en ratones infectados con huevos larvados de <i>Toxocara canis</i>	60
6.8 Observación del comportamiento en los diferentes grupos.....	68
7. DISCUSIÓN.....	69
8. CONCLUSIONES.....	78
9. BIBLIOGRAFÍA.....	80

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1: Estudios variados de prevalencia de *T. Canis* en Latinoamérica. (Basado en la revisión realizada por Olinda Delgado & Alfonso J. Rodríguez-Morales en 2009).....25
- Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados para la Reacción en Cadena de la polimerasa de B-actina, *Toxocara canis* y genes apoptóticos.....40
- Tabla 3: Condiciones utilizadas para la Reacción en Cadena de la Polimerasa de B-actina, *Toxocara canis* y genes apoptóticos.....40
- Tabla 4: Relación de nematodos adultos por municipio.....43
- Tabla 5: Comparación de la contaminación entre los medios de cultivo utilizados.....45
- Tabla 6: Número de larvas encontradas en otros órganos en el grupo infectado con huevos de *Toxocara canis*48
- Tabla 7: Resultados del análisis por densitometría de la amplificación del gen beta actina.....51
- Tabla 8: Resultados del análisis por densitometría de la amplificación del gen ITS2 de *Toxocara canis*52
- Tabla 9: Valores obtenidos de la electroforesis de la PCR del gen Bax.....55
- Tabla 10: Valores obtenidos de la electroforesis de la PCR del gen Bcl2...55
- Tabla 11: Valores obtenidos de la electroforesis de la PCR del gen BclxL.....56
- Tabla 12: Análisis por densitometría de la amplificación de los genes ITS2, Bax, Bcl2 y Bclx-L en relación con los resultados del análisis del gen de betaactina.....57

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Adultos de *Toxocara canis* (Fuente: Flores A 2014).....6
- Figura 2: A) Larvas de *T. canis* identificadas por medio de triquinoscopía
B) Cultivo de huevos de *T. canis*7
- Figura 3: Ciclo biológico de *Toxocara canis*. Fuente: CDC
www.dpd.cdc.gov/dpdx.....10
- Figura 4: Distribución mundial de *Toxocara canis* Fuente: GIDEON,
<http://www.gideononline.com/> (2007).24
- Figura 5: A) Huevos de *Toxocara canis* en etapa de Larva 2, B) Proceso
de disección de nematodos adultos bajo el estereoscopio.....44
- Figura 6: Cajas de cultivo de huevos con medio de cultivo de Hidróxido
de sodio (izquierda) que no muestra contaminación y solución salina con
antibiótico antifúngico (derecha) que muestra contaminación.....45
- Figura 7: A) Inoculación intraoral, B) Disección de la porción anterior del
útero de nematodo (fuente: Flores A.) C) Identificación de nematodos
(fuente: Flores A.)47
- Figura 8: Extracción total del sistema nervioso central.....48
- Figura 9: Larvas de *T. canis* observada por el método de compresión
tisular en cerebro de ratón del grupo tratamiento.49
- Figura 10: Gradiente de temperaturas para amplificación del gen de beta
actina.....50
- Figura 11: Amplificación de b-actina. Fragmento de 430 pb.....51
- Figura 12: Amplificación del gen ITS2 para detección molecular de
Toxocara canis en grupo tratamiento.52
- Figura 13: Electroforesis de los productos de amplificación para el gen
Bax en grupo tratamiento y en el grupo control.....53
- Figura 14: Electroforesis de la reacción de la cadena de la polimerasa
del gen Bcl2 en grupo tratamiento y en el grupo control.....54
- Figura 15: A) Electroforesis de los productos de amplificación para el
gen Bclx-L en grupo tratamiento y en el grupo control. B) Electroforesis

de la reacción de la cadena de la polimerasa del gen Bclx-S en grupo tratamiento y en el grupo control.	54
• Figura 16: Técnica de TUNEL en tejido cerebral. A) Control positivo B) Control negativo.....	58
• Figura 17: A) Células piramidales cerebelares positivas por la técnica de TUNEL B) Células gliales positivas cercanas a la corteza cerebral C) Células piramidales cerebelares positivas. D) Larvas en cerebro medio.	59
• Figura 18: Larva en cerebro medio. 40X H&E.....	61
• Figura 19: Larva en cerebro medio. 40X Tinción de Masson.	61
• Figura 20: Larva en cerebro medio. 100X PA.....	62
• Figura 21: A) Larva en líquido cefalorraquídeo a nivel de hipotálamo. 40X H&E B) Larva en líquido cefalorraquídeo a nivel de hipotálamo. 100X PAS.....	63
• Figura 22: Zonas de desmielinización y edema perivascular. Corteza prefrontal. 40X PAS.....	64
• Figura 23: A) Edema perivascular. Cerebro medio. 40X PAS B) Edema perivascular. Cerebro medio. 40X H&E.....	64
• Figura 24: Edema perivascular e infiltración perivascular. Cerebro medio. 40X PAS.....	65
• Figura 25: Microgliosis Cerebro medio. 40X H&E.....	66
• Figura 26. Hemorragia en cerebro medio. 40X H&E Figura 27. Edema perivascular. Cerebro medio. 40X H&E.....	66
• Figura 27: Condensación de cromatina y fragmentación nuclear en neurona en cerebro medio. 100X PAS.....	67
• Figura 28: Cambios de comportamiento en grupo tratamiento Vs grupo control.	68

ÍNDICE DE GRÁFICAS

- Gráfica 1: Comparación del periodo de maduración entre tres lotes de cultivo de huevos.46
- Gráfica 2: Número de larvas en cerebro encontradas en ratones centinela en relación con el periodo de infección.....49

ABREVIATURAS

<i>T. canis</i>	<i>Toxocara canis</i>
LMV	Larva Migrans Visceral
LMO	Larva Migrans Ocular
NT	Neurotoxocariosis
ADN	Ácido desoxurribonucleico
gr	Gramos
ml	Mililitro
Mm	Milimolar
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
ITS2	Second internal transcribed spacer region
Taq	Polimerasa de <i>Thermophilus aquaticus</i>
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
PAS	Ácido peryodico schiff
H&E	Hematoxilina y eosina
T.M.	Tinción de Masson
rpm	Revoluciones por minuto
DEPC	Dietilpirocarbonato
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
µg	Microgramo

μl		Microlitro
ADNc	Ácido desoxirrubonucleico complementario	
ARN		Ácido ribonucleico
°C		Grados Celsius
B-actina		Beta actina

RESUMEN

La toxocariosis es una zoonosis parasitaria de gran importancia para la salud pública debido a su capacidad migratoria en el hospedador paraténico y a la alta prevalencia del parásito en los perros callejeros y mascotas.

La migración de *T. canis* a cerebro en humanos se ha relacionado con personas diagnosticadas con diversos trastornos neurológicos que afectan significativamente la calidad de vida de la persona, por lo que se vuelve importante conocer el verdadero efecto de la migración en cerebro de la larva de *T. canis*.

En objetivo del presente estudio fue la evaluación del efecto de la migración somática de la larva de *Toxocara canis* sobre la viabilidad de las células del sistema nervioso central mediante el análisis de la alteración de genes relacionados con procesos de muerte celular programada en donde se pudo observar expresión del gen pro apoptótico Bax en los ratones que cursaban neurotoxocariosis en relación a los ratones control. A la par se evaluó apoptosis en el tejido mediante la técnica de TUNEL, identificándose escasas células positivas en la capa granular del cerebelo. Se analizaron los tejidos infectados por medio de histopatología utilizando las tinciones H&E, PAS y Tinción de Masson, identificando en la totalidad de los individuos inoculados larvas distribuidas en cerebro medio cercanas al hipocampo, junto con la descripción de hemorragias, microgliosis, desmielinización en cerebro medio y edema perivascular en la totalidad del encéfalo.

Los resultados obtenidos en el presente estudio aportan datos que ayudan a la comprensión del efecto de una migración somática a cerebro en los hospedadores paraténicos. Los resultados demuestran alteraciones significativas en la homeostasis del sistema nervioso central y la integridad de las células nerviosas y sugieren cambios que pueden representar un peligro importante para el individuo que adquiere la forma neurológica.

1. INTRODUCCIÓN

Toxocara canis es un helminto de la familia de los Ascaroideos que suele infectar en mayor medida a caninos. Es causante de la enfermedad zoonótica toxocariosis la cual es una de las infecciones parasitarias más comunes que se conocen y se encuentra distribuida a nivel mundial (Sariego I, Kanobana K, Núñez F. 2012)

El ciclo biológico de *T. canis* a pesar de ser un ciclo directo es algo complejo puesto que se conocen cuatro posibilidades de infección: directa: mediante la ingestión de huevos embrionados; indirecta: mediante hospedadores intermediarios, placentaria o prenatal y galactógena y comienza por la ovoposición de huevos sin larvar en el intestino delgado, que salen posteriormente con las heces; éstos huevos pueden permanecer viables en el exterior desde varios meses hasta un año. Si se reúnen las condiciones adecuadas, principalmente humedad y temperatura, el desarrollo de la larva infectante (larva dos) se logrará dentro de 2 a 5 semanas. La larva dos (L-II) permanece dentro del huevo desde la primera muda hasta la ingestión por un hospedador. La liberación de la larva infectante se produce en el hospedero, sin embargo existe la posibilidad de la intervención de un hospedero paraténico (roedores, aves, algunos invertebrados, humano, etc.) en los cuales la larva permanece infectante enquistada en algún tejido (Despommier, D. 2003).

Una vez ingeridas, las larvas eclosionan del huevo y penetran la mucosa del intestino delgado a nivel del duodeno, al alcanzar la circulación sanguínea se inicia una migración intraorgánica, a las 24-48 horas, llegan al hígado por vía porta. (De la Fé P., Duménigo B., Brito E., Aguiar J. 2006).

Algunas larvas pueden quedar retenidas debido a reacciones inflamatorias tisulares, otras continúan hacia los pulmones. Una vez en pulmones las larvas pueden seguir dos vías. Una de ellas consiste en una migración traqueodisgestiva,

se inicia al atravesar los alvéolos y ascender a las vías respiratorias altas, para posteriormente ser deglutidas por medio de las secreciones traqueobronquiales y pasar posteriormente al aparato digestivo, donde continuará su desarrollo finalizando en el intestino delgado con la última muda a larva cinco (L-5), que es el estado adulto y que se alcanzará en un tiempo de 3 a 5 semanas posterior a la infección. En intestino los parásitos adultos se reproducen y el ciclo termina con la expulsión de huevos en las heces. Esto suele suceder en caninos de menos de 6 meses. Sin embargo en individuos de más de 6 meses, así como en hospederos no habituales de *T. canis*; la larva no suele atravesar el alvéolo, por lo que continúa su migración somática, invadiendo músculo, hígado, riñones, útero, glándula mamaria, cerebro, etc (De la Fé P., Duménigo B., Brito E., Aguiar J. 2006).

Las larvas de *Toxocara canis* pueden afectar distintos órganos, las larvas pueden migrar y producir granulomas en hígado, pulmones, cerebro, ojos y ganglios, el número estará en proporción directa al número de huevos larvados infectantes ingeridos. Dependiendo la ubicación de la migración será la presentación del cuadro clínico. Estudios han demostrado compromiso del sistema nervioso central, al existir migración larvaria a cerebro. Este fenómeno resulta preocupante al hablar de una enfermedad zoonótica y con un potencial peligroso significativo en la salud pública (Del Valle G., Radman N., Burgos L., Archeli S. 2002). Sin embargo, pocos estudios se han realizado para estudiar el efecto de la larva en la integridad celular del tejido cerebral. Existen dos artículos que reportan alteraciones morfológicas en histiocitos cerebrales que sugieren apoptosis, sin embargo estudios moleculares son requeridos para confirmar el verdadero efecto de la larva en los diversos tipos celulares del tejido cerebral (Hsiao W. Et al. 2013 & Zheng S., Li, J. Shen Ji., Wang X. 2006).

Por otro lado, existen estudios que han encontrado relación entre el diagnóstico de diferentes desordenes neuropsicopatológicos en humanos como esquizofrenia, trastorno del déficit de atención, entre otros y la seropositividad. No se entiende del todo las causas de la mayoría de este tipo de enfermedades, sin

embargo se cree que existe una relación de factores genéticos y ambientales, por lo que diversos estudios de los últimos años se han enfocado en encontrar una etiología que explique el desarrollo de los síntomas característicos de estas enfermedades y *Toxocara canis* es uno de los posibles candidatos (Hollad C., Hamilton C. 2013).

Existe una relación cercana entre la muerte celular programada y la presencia de enfermedades neurológicas crónicas y progresivas cuya etiología no es aún completamente entendida, por lo que es importante estudiar las posibles causas que pudieran ocasionar que las células cerebrales comiencen a exacerbar procesos apoptóticos que pongan en peligro la vida del individuo.

La toxocariosis es una infección con un gran potencial zoonótico, que podría tener repercusiones importantes en la calidad de vida de la persona que adquiere la forma neurológica. Debido a esto, se vuelve imperativo el estudio del verdadero efecto que tiene la larva una vez que invade el cerebro sobre las células del mismo, y el impacto para la vida del individuo afectado. En este trabajo se pretende asociar la presencia de larvas de *T. canis* en cerebro y la inducción de apoptosis.

2. HIPÓTESIS

La migración a cerebro de larvas de *Toxocara canis* en hospederos paraténicos induce apoptosis en células del sistema nervioso central.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Relacionar la presencia de migración larvaria de *Toxocara canis* a cerebro con la inducción de apoptosis en células del sistema nervioso central.

3.2 Objetivos específicos

- Obtener huevos larvados de *Toxocara canis* a partir del cultivo de huevos recuperados de nemátodos adultos.
- Establecer un modelo murino de infección de *T.canis* mediante la administración oral de huevos larvados.
- Identificar y confirmar la presencia de la larva en el cerebro de ratones infectados experimentalmente con huevos larvados de *T. canis* mediante la técnica de compresión tisular.
- Determinar la alteración en la expresión de los genes Bcl/2, Bcl/XL y Bax en el tejido cerebral de animales infectados.
- Evaluar la presencia de apoptosis mediante la técnica de TUNEL en tejido cerebral de los ratones infectados diferenciando el tipo celular afectado (microglia y neurona).
- Analizar las lesiones en cerebro de los ratones infectados con huevos embrionados de *T. canis* por histopatología.

4. ANTECEDENTES

4.1 Generalidades de *Toxocara canis*

Toxocara canis es un nemátodo perteneciente al orden Ascaridida y que parasita el intestino delgado de cánidos, utilizándolos como sus hospederos definitivos, sin embargo *Toxocara canis* (*T. canis*) tiene la capacidad de infectar a numerosos hospederos paraténicos en los que no se desarrolla la forma adulta sino que permanece infectiva realizando una migración somática.

La clasificación Taxonómica actual de *Toxocara canis* es la siguiente:

Dominio: Eukaryota

Reino: Animalia

Subreino: Bilateria

Rama: Protostomia

Infrareino: Ecdysozoa

Superphylum: Aschelminthes

Phylum: Nematelminthes

Clase: Secernentea

Subclase: Rhabditia

Orden: Ascaridida

Suborden: Ascaridina

Superfamilia: Ascaridoidea

Familia: Toxocaridae

Genero: *Toxocara* Especie: *canis*

(De la Fé Rodríguez *et al.* 2006)

Dentro del orden en el que se incluye *Toxocara canis* se han descrito más de 50 géneros que han sido analizados arduamente para establecer clasificaciones más asertivas y adecuadas a los taxones correspondientes, y dentro del género *Toxocara* se han descrito más de 24 especies distribuidas en

todo el mundo y que tienen como hospederos definitivos diferentes especies animales. (De la Fé Rodríguez, D., Duménigo Ripoll, D., Brito Alberto, D., & Aguiar Sotelo, D., 2006).

Los adultos de *Toxocara canis* suelen ser mas pequeños que el resto de los integrantes de la familia de los Ascaroideos, se pueden identificar macroscópicamente por su cuerpo redondo y sus extremos ahusados, su sistema digestivo es completo en forma tubular, además de esto se caracterizan por la presencia de tres labios prominentes con bordes dentados en la porción anterior así como la presencia de dos expansiones cuticulares en forma de alas cervicales longitudinales y delgadas y los bordes hipodérmicos pueden ser detectados fácilmente. (Nieves, A., Ortega, B., Martínez, M., *et. al.*, 2012)

Las especies de *Toxocara canis* son parásitos dioicos, lo que significa que existen individuos sexualmente diferenciados por características morfológicas y biológicas que les otorgan dimorfismo sexual, en el caso de las hembras adultas, pueden llegar a medir de 6 a 15 centímetros, poseen un extremo distal con terminación en punta roma, la vulva se puede encontrar a un tercio desde la porción anterior y posee grandes ovarios que pueden encontrarse en gran parte de la extensión del parásito, el útero puede contener más de 20 millones de huevos, encontrándose los más grávidos cercanos al poro excretor. En el caso de los machos el extremo distal es curvo y la cola muy puntiaguda, poseen espículas desiguales sin presencia de gobernáculo, los machos pueden llegar a medir de 4 a 7 centímetros de largo y suelen tener un diámetro menor que las hembras. (Brunaska, M., P. Dubinsky, K. Teiterova. 1995)



Figura 1. Adultos de *Toxocara canis* (Fuente: Flores, Alejandra 2014).

Los huevos de *Toxocara canis* son prácticamente esféricos y al ser

ovopositados son blastomerados necesitando tiempo en el medio ambiente con condiciones específicas para poder embrionar y desarrollar la larva infectiva. Los huevos son de color pardo amarillento y poseen una pared gruesa de aspecto granular y pueden llegar a medir de entre 72 a 85 μm . La gruesa pared que poseen los huevos de *Toxocara canis* les confieren una alta capacidad de supervivencia pudiendo resistir temperaturas sumamente extremas y permanecer viables desde 6 meses hasta varios años en el ambiente, sin embargo son sumamente vulnerables a la desecación. La etapa infectiva de *Toxocara canis* es la larva 2 dentro del huevo, una vez dentro del organismo éstas eclosionan y pueden ser identificadas por poseer características propias de la especie así como un tamaño de 300 a 400 μm de largo y entre 18 y 20 de diámetro, el esófago mide aproximadamente un tercio del total del largo del cuerpo y las alas cervicales pueden ser observadas en la porción anterior del parásito (Nichols, 1956). (Nichols, 1956 & Holland, C., & Smith, H., 2006).

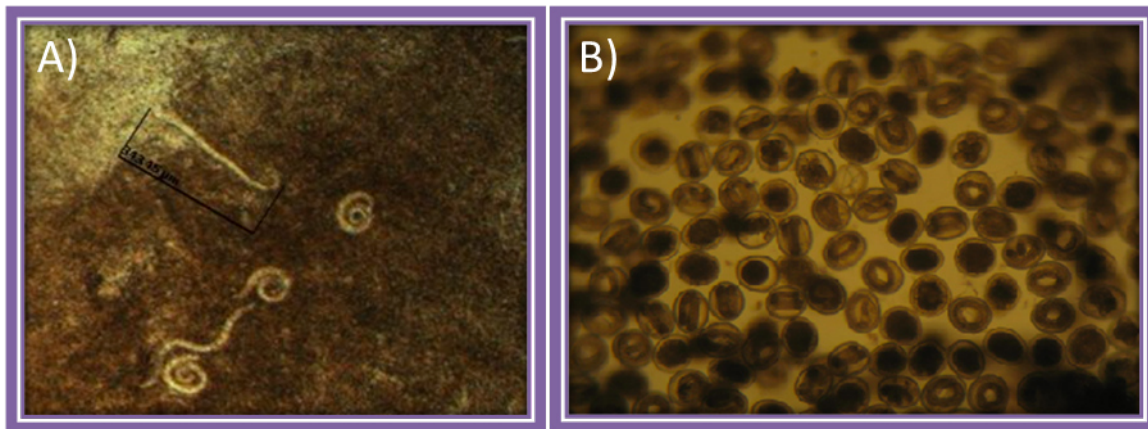


Figura 2. A) Larvas de *T. canis* identificadas por medio de triquinoscopía B) Cultivo de huevos de *T. canis*

4.2 Ciclo biológico de *Toxocara canis*

En el hospedero definitivo (cánidos) existen numerosas formas por las cuales pueden adquirir *Toxocara canis* entre ellas se encuentra la vía transplacentaria, la vía galactogénica y la más común por medio de ingestión de huevos embrionados (huevos con larva 2). (Johnstone, Colin D. 2000).

Los huevos no embrionados son excretados en las heces de animales infectados por *Toxocara canis*, los huevos depositados en los suelos comienzan a madurar, teniendo como condiciones óptimas rangos de humedad de 50% a 70% y temperaturas de 25°C a 35°C obteniendo la etapa infectiva (huevo larvado) en mínimo 10 días, sin embargo el periodo de maduración puede prolongarse desde meses hasta años en condiciones donde las temperaturas están por debajo de los 19°C. Solo los huevos larvados son capaces de producir una infección por *Toxocara canis*. (Beaver PC, Jung RC, Cupp EW. 1984).

Los cánidos se infectan de manera accidental ingiriendo los huevos larvados de suelos o superficies contaminados, una vez en el intestino delgado las larvas eclosionan del huevo y penetran la mucosa intestinal hasta alcanzar la corriente sanguínea, una vez dentro de los vasos sanguíneos son llevados hasta los pulmones donde migran hasta los alvéolos y posteriormente a los bronquios, bronquiolos y la tráquea donde por medio de las secreciones del sistema respiratorio son expulsados y deglutidos de nuevo para llegar por segunda ocasión al intestino delgado donde solo de esta manera lograrán desarrollarse hasta adultos después de 60 a 90 días que la larva eclosionó en el intestino, una vez completado su desarrollo comienzan a reproducirse para producir huevos blastomerados que serán excretados en las heces contaminando los suelos. El ciclo completo suele desarrollarse en la mayoría de los casos en cánidos menores de 6 meses, por lo que los cachorros son los principales agentes involucrados en la contaminación del suelo. (Despommier, D. 2003).

En cánidos adultos, la deglución de la larva migratoria para dar paso al adulto es muy poco frecuente en animales mayores de un año, e inexistente en hospederos paraténicos (como roedores, conejos y el humano), en el caso de estos individuos (cánidos adultos y hospederos paraténicos) la larva eclosiona en el intestino, penetra la mucosa y alcanza la circulación sanguínea, sin embargo, permanece en una migración somática donde puede alcanzar diversos órganos teniendo tropismo por el hígado, músculo, ojo y cerebro. Esta etapa es especialmente peligrosa para los hospederos paraténicos ya que la larva afecta potencialmente órganos vitales. (Glickman, L.T., and P.M Schantz. (1981).

En los cánidos las larvas migratorias pueden permanecer viajando por varios meses o permanecer en alguno de los órganos antes mencionados en estado de hipobiosis hasta que existan condiciones fisiológicas que predispongan la reactivación de las larvas y el comienzo de una nueva migración somática.

En perras gestantes se cree que la prolactina puede jugar un papel importante en la reactivación de larvas hipobióticas que podrían atravesar la barrera transplacentaria e infectar a los cachorros desde el útero. Las larvas en los cachorros se acumularán en el hígado hasta el nacimiento, que será cuando comiencen la migración que tendrá como objetivo el llegar a la tráquea para ser deglutidos y en aproximadamente dos semanas desarrollar la etapa adulta en el intestino para poder reproducirse y excretar huevos en las heces (Burke M., Roberson E. 1985)

La hembra cánida adulta infectada puede infectar de igual forma a los cachorros mediante leche contaminada por larvas reactivadas al iniciar el proceso de gestación y lactación, en este caso el desarrollo del parásito adulto se completará al momento de llegar al intestino delgado de los cachorros lactantes. La infección transplacentaria y transmamaria es exclusiva de los hospederos definitivos (Overgaauw P. A. 1997).

Un factor que juega un papel importante en la transmisión de la parasitosis por *Toxocara canis* es la ingestión de hospederos paraténicos infectados que entran dentro de la cadena trófica de los hospederos definitivos (ejemplo: roedores o liebres). Así, caninos que suelen cazar, son susceptibles a adquirir la enfermedad mediante la ingestión de larvas enquistadas en hospederos paraténicos (Strube C., Heuer L., Janecek E. 2013).

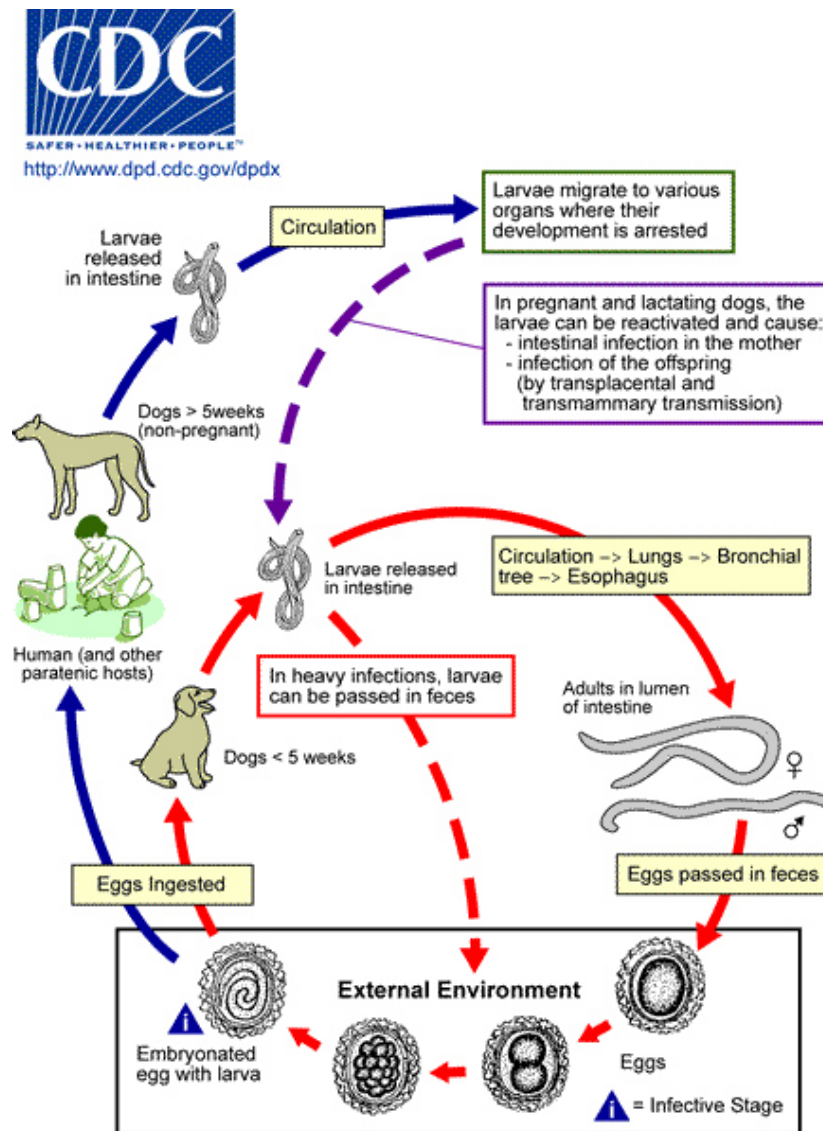


Figura 3. Ciclo biológico de *Toxocara canis*. Fuente: CDC www.dpd.cdc.gov/dpdx

4.3 Toxocariosis

La Toxocariosis es una enfermedad zoonótica producida por la infección del parásito *Toxocara canis*, como anteriormente se mencionó, *Toxocara canis* tiene como hospedero definitivo los cánidos dónde en cachorros de menos de 6 meses se desarrolla el adulto en el intestino delgado, sin embargo existen una serie de hospedadores paraténicos en los que el parásito realiza una migración somática afectando órganos vitales como el hígado, riñón, pulmones, ojo y cerebro y la sintomatología presentada se relacionará al tejido afectado. (Minvielle MC, Niefeld G, Ciarmela ML, Basualdo JA, 1999)

4.3.1 Toxocariosis en hospederos definitivos

4.3.1.1 Caninos menores de 6 meses

Los caninos menores de 6 meses son los principales portadores de los adultos capaces de reproducirse en el intestino de los mismos, para que esto suceda, como se describe en el apartado de ciclo biológico, es necesario una migración somática primaria que tendrá como lugar blanco el pulmón (en alrededor de 36 a 40 horas post-infección) dónde posteriormente, el parásito será deglutido, éste paso obligatorio por las vías altas del sistema respiratorio ocasiona presencia de signología respiratoria como tos y descarga nasal acompañada en algunas ocasiones por fiebre, resultante de la secreción de las mudas y ecdiscs de la larva, y suele remitir en 2 o tres semanas (Nestor J, Pasamonte L, Marinconz R *et al.*, 2000).

En cuanto a la forma entérica, los cachorros suelen presentar diarrea, distensión abdominal ocasionada por la presencia de adultos en el intestino que puede evolucionar en una obstrucción mecánica por los adultos ocupando la totalidad de la luz intestinal, el abdomen se observará inflamado y frecuentemente los cachorros presentan dolor a la palpación; en infestaciones graves se puede

presentar tenesmo, anorexia, vómito, pérdida de peso y deshidratación (Aldawek AM, Levkut M, Revajova V, *et al.* 2002).

4.3.1.2 Caninos mayores de 6 meses

En el caso de los caninos mayores de 6 meses la presentación entérica es prácticamente ausente, sin embargo la infección suele ser silenciosa ya que en estos hospedadores la larva permanece en estado de migración somática afectando diferentes órganos, pudiendo encontrar lesiones similares a lo que sucede en el hospedero paraténico (ver sección 4.3.2), sin embargo en los caninos mayores de 6 meses las larvas permanecen en estado de hipobiosis donde podrán ser reactivadas mediante la gestación para afectar a los cachorros por vía transplacentaria o transmamaria (Barriga, O.O., 1988).

4.3.2 Toxocariosis en hospederos paraténicos

Como se había mencionado con anterioridad *Toxocara canis* cuenta con una serie de hospederos paraténicos (dentro de los cuáles se encuentra el hombre) donde la larva eclosiona bajo las mismas condiciones y características que lo hace en el hospedero definitivo, sin embargo en los hospederos paraténicos (y en perros mayores de 6 meses) no evoluciona hasta el estado adulto y permanece como larva somática que puede permanecer en estado latente en diferentes órganos. (Brunaská, M., Dubinsky, P., Reiterová, K., 1995).

La larva eclosiona de 2 a 4 horas post-ingestión en la porción más anterior del intestino delgado (duodeno) donde penetra para alcanzar la circulación sanguínea y alcanzar el hígado en las siguientes 24 horas y posteriormente los pulmones 12 horas después (Webster G.A. 1985). Después de completar la ruta hepato-pulmonar las larvas vuelven a entrar a la circulación sanguínea y comienzan a realizar migraciones por diferentes órganos, sin embargo se desconoce a ciencia cierta los factores que determinan la distribución en los

tejidos, se ha propuesto que el tropismo de la larva en los hospederos paraténicos puede seguir un patrón determinado según la especie afectada (Magnaval 2001), sin embargo se ha visto cierto tropismo en la mayoría de los hospederos paraténicos por el sistema nervioso central (Akao, N. 2006). Una vez localizada en estos tejidos puede permanecer hasta 10 años viables y a la espera de continuar su ciclo biológico cuando el paraténico sea ingerido por el hospedero definitivo.

Se han utilizado diferentes modelos experimentales de toxocariosis para tratar de entender diferentes aspectos de la infección, también se ha tratado de entablar un modelo que pueda emular las condiciones de la infección que se presentan en los humanos, sin embargo en cada especie se pueden observar algunas particularidades. Cristina Strube y colaboradores en el 2013 describieron diferentes características en diferentes hospedadores paraténicos, algunas de las cuáles se mencionan a continuación, sin embargo, el rango de hospederos paraténicos para *Toxocara canis* es sumamente amplio y es necesario la identificación de todos los posibles hospederos accidentales que representen un foco de infección al pertenecer a la cadena trófica.

Los roedores han sido utilizados en numerosos estudios como modelo de infección experimental con *Toxocara canis* encontrándose cepas especialmente susceptibles (Cox, D.M., Holland, C.V., 1998). En general el patrón de migración se puede dividir en la primera migración hepato-pulmonar que ocurre alrededor de la primera semana posteriormente en una migración con tropismo por sistema nervioso y sistema muscular, pudiendo permanecer viables por mínimo un año y hasta por 10 años (Sprenst, 1952). Estudios han demostrado que a dosis de infección por debajo de 500 huevos disminuye la posibilidad de encontrar larvas en hígado, sugiriendo una tendencia a migrar hacia cerebro (Havasiová-Reiterová et al., 1995 & Camparoto et al., 2008).

La cepa Balb/c muestra una alta susceptibilidad en comparación con otras cepas (BALB, C3H, C57Bl, DBA and NMRI) a sufrir neurotoxocariosis ya que

existen diferentes estudios que registran un número superior de larvas en cerebro que las cuantificadas en las demás cepas utilizadas como modelos (Hamilton, C.M. 2006 et al.). Sin embargo a pesar de tener un mayor número de larvas, la cepa Balb/c presenta menor morbilidad y mortalidad que el resto de los modelos en los que se observaba una elevada tasa de mortalidad entre los días 15 y 21 (Ollero M.D. et al 2008).

La transmisión transplacentaria y galactogénica en hospederos paraténicos es generalmente considerada nula o inexistente, sin embargo existen estudios realizados en ratones donde se ha podido comprobar transmisión transplacentaria y galactogénica bajo condiciones especiales. En estos estudios se comprobó la presencia de larvas en placenta en el día 9 de la gestación e infección del feto en el día 11 de la gestación en ratones que fueron infectados solo durante la gestación y los principales daños reportados fueron abortos en un 21% y disminución del tamaño de la camada. (Oteifa, N.M., et al 1996. & Reiterová, K., Tomasovicová, O., Dubinsky, P., 2003.).

En otros estudios se analizó el potencial riesgo de transmisión galactogénica en hospederos paraténicos utilizando ratones como modelos experimentales analizando el efecto de la administración de prolactina en ratones infectados de *Toxocara canis*, se comprobó que tras la administración de prolactina las larvas tisulares disminuían y podrían recolectarse larvas somáticas en leche materna, solo en los ratones que fueron infectados durante la gestación, lo que sugiere a la vía galactogénica como una potencial fuente de contagio en neonatos. (Jin, Z., Akao, N., Ohta, N., 2008).

En cuanto a la utilización de ratas como modelo experimental, se ha observado un patrón de migración similar al observado en ratones, la fase hepato pulmonar sucede en la primera semana y se observa de igual forma un tropismo importante a cerebro siendo el cerebelo el órgano más afectado, sin embargo, parecer ser que la migración sucede más lento en las ratas que en los ratones (Zibaei, M., Sadjjadi, S.M., Uga, S., 2010).

En relación a los gerbos como modelos experimentales se han descrito ser específicamente útiles como modelos de toxocariosis ocular ya que las larvas que infectan estos hospederos presentan gran afinidad por el nervio óptico, el tropismo es tan notorio que algunos autores reportan encontrar larvas en nervio óptico en el 50% de los gerbos infectados al día siguiente de la infección y el 90% presentaban larvas en los ojos entre los días 1 y 90 post-infección. (Akao, N. *et al.*, 2003).

Algunos autores han tratado de proponer al cerdo como un modelo de toxocariosis humana debido a la similitud en la reacción inmunológica, fisiología y metabolismo, sin embargo diversos estudios han encontrado algunas discrepancias que ponen en duda el potencia de su uso como un modelo objetivo de toxocariosis. En cerdos se ha observado que, como en los roedores que fungen como hospederos paraténicos, las larvas se acumulan en el hígado en una etapa inicial, sin embargo suelen migrar a músculo, corazón, cerebro no encontrándose afinidad específica en cerebro, además de esto en ninguno de los estudios pudo observarse larvas en ojo. Las larvas en los tejidos de los cerdos parecen tener una duración muy limitada ya que el número de larvas comienza a disminuir desde el día 7 siendo imposible detectar alguna para el día 126, a diferencia del ratón en el que las larvas podrían permanecer viables en los tejidos por años. (Sommerfelt, I.E *et al.*, 2004).

La migración de *Toxocara canis* en aves ha sido estudiada debido a su papel como posible fuente de infección para el humano, ya que las larvas permanecen en los tejidos de estas especies por más de 3 años y pueden representar un foco de infección para el hospedero (paraténico y definitivo) que ingiere los tejidos. Se ha observado que a diferencia de los demás hospedadores paraténicos en las aves, las larvas suelen permanecer en hígado y pulmón y realizar una re-infección en el hígado siendo recuperadas el mayor número de larvas de estos órganos, muy pocas larvas pueden recuperarse de otros tejidos en esta especie. Las aves de producción representan un especial foco de atención

para la infección de *Toxocara canis* ya que se ha observado una gran resistencia de las larvas a altas temperaturas (Taira, K., Permin, A., Kapel, C.M., 2003).

4.3.3 Toxocariosis Humana

Poco se conoce de la migración de *Toxocara canis* en humanos, sin embargo, se han sugerido teorías de su patrón de migración basados en pocos estudios realizados en primates no humanos principalmente macacos, en estos estudios se ha registrado un patrón de migración similar al observado en ratones, al igual que la afinidad por sistema nervioso central y la longevidad de la larva viable en el tejido de 15 meses hasta 10 años. También se ha registrado que los signos neurológicos en primates suelen aparecer a partir de los 6-15 días, sugiriendo el periodo que tarda la larva en alcanzar el sistema nervioso central (Watzke, R.C., Oaks, J.A., Folk, J.C., 1984 & Glickman, L.T., Summers, B.A., 1983 & Beaver, P.C., 1969).

4.3.3.1. Clínica de la Toxocariosis

En el humano se han descrito 3 síndromes relacionados con la toxocariosis, el primero es el síndrome de Larva Migrans Visceral (LMV), síndrome de Larva Migrans Ocular (LMO), hasta hace algunos años ha tomado importancia la forma neurológica o neurotoxocariosis (NT), Toxocariosis Asintomática (TA) y algunos autores utilizan una quinta clasificación denominada toxocariosis encubierta (TE), sin embargo, poco se ha descrito al respecto (Magnaval, J.F., *et al.*, 2001.) La signología de la enfermedad puede ser sumamente variada e inespecífica pues dependerá en gran medida del órgano afectado y la severidad de la enfermedad dependerá de las condiciones inmunológicas y la edad del hospedador, el número de larvas involucradas en la infección y la importancia del órgano infectado.

La presentación denominada Larva Migrans Visceral se caracteriza principalmente por una alta presencia de eosinófilos en sangre y en el tejido

afectado, se observa principalmente hepatoesplenomegalia, hipergammaglobulinemia y afectación pulmonar en cuadros donde más de un órgano se encuentra comprometido, su severidad se determinará como se mencionó anteriormente por la carga parasitaria, el estado y la edad del hospedero afectado, siendo los individuos inmunocomprometidos los más vulnerables (De la Fé Rodríguez *et al.* 2006).

Los signos inespecíficos típicos de esta enfermedad son hipertermia, anorexia, pérdida de peso, tos, esputo, disnea, diarrea, náusea, vómito, eczema etc, y se presentarán dependiendo del órgano afectado. (Noh Y, Hong ST, Yun JY, *et al.*, 2012)

Los individuos afectados pueden reportar tos, dificultad respiratoria, problemas oculares desde conjuntivitis hasta uveítis, fiebre y eczema, los trastornos respiratorios pueden desencadenar asma e incluso se ha reportado la presencia de artritis eosinofílica por la migración larvaria (Rayes, A. A., and J. R. Lambertucci. 2001). En casos que se consideran una complicación del síndrome se ha reportado endocarditis y fibrosis del miocardio, teniendo graves repercusiones en el individuo afectado. (Prunier, F., S. Delpine, and J. Victor. 2001). La formación de granulomas eosinofílicos es común en todos los órganos invadidos a excepción de cerebro y ojo (Fioretti D, P.*et al.* 1989), y según la gravedad del mismo puede comprometer la integridad del órgano afectado.

La mortalidad suele ser muy baja, sin embargo, cuando sucede, suele ser en individuos inmunocomprometidos o con un sistema inmunológico inmaduro (como niños), y suele relacionarse con una complicación cardíaca o pulmonar (Hill IR, Denham DA, Scholtz CL, 1985).

Existe una presentación que suele ser considerada la más común y la más subdiagnosticada que es la toxocariosis encubierta que se caracteriza principalmente por la presencia de fiebre, dolor de cabeza, cambios conductuales, alteraciones del sueño, náuseas, debilidad, salpullido, dolor abdominal, etc, y es necesario el diagnóstico serológico (Poulsen CS, Skov S, Yoshida A, *et al.* 2015).

La presentación ocular (LMO) puede ser una complicación de la presentación visceral donde la larva se localiza en la cámara anterior del ojo, la principal lesión observada es la formación de granulomas eosinofílicos, sin embargo es frecuente observar leucocoria, exotropia, uveítis con hipopión, absceso vítreo y endoftalmitis, en la mayoría de los casos las lesiones se presentan de manera unilateral, sin embargo en algunos casos sumamente raros es posible ver compromiso de ambos ojos. Las complicaciones más graves pueden ser desde ulceración, atrofia del globo ocular, granuloma en la retina, hasta ceguera. Los pacientes suelen llegar a consulta reportando conjuntivitis así como molestia general con lagrimeo excesivo. La presentación ocular suele presentarse en mayor proporción en niños menores de 10 años (Espinoza Y, *et al.* 2003)

La presentación cerebral ha sido estudiada hasta hace poco, se ha determinado su afinidad neural en diferentes especies y ha ganado interés debido a sus posibles consecuencias sobre la calidad de vida del hospedero humano, sin embargo la forma cerebral es poco entendida a pesar de considerarse común (Finsterer J, Auer H., 2007).

La neurotoxocariosis se ha asociado fuertemente con la presentación de cuadros epilépticos idiopáticos, retraso mental así como enfermedades psiquiátricas, sin embargo, algunos autores han señalado que son más bien los hábitos que desarrollan este tipo de individuos (como la geofagia) lo que los hacen susceptibles a estar expuestos con mayor prevalencia que el resto de la población a las formas infectivas de *Toxocara canis* (Quattrocchi G., Nicoletti A, Marin B., *et al* 2012). En algunos estudios se ha asociado el bajo rendimiento escolar, el déficit de atención e hiperactividad y trastornos neuropsiquiátricos como esquizofrenia en individuos seropositivos a *Toxocara canis* (Worley G, Green J, Frothingham T, SturnerR, Walls K, Pakalnis V, Ellis G 1984). (Huminer D, Symon K, Groskopf. *et al.*1992). (Kaplan M, Kalkan A, Kuk S, *et al.* SS, 2008)

La mayoría de los casos reportados de neurotoxocariosis cursan con eosinofilia en sangre y líquido cerebro espinal y altos títulos de anticuerpos para

Toxocara canis en sangre, en el líquido cefalorraquídeo también es frecuente identificar pleocytosis. Las principales lesiones que se pueden observar en esta presentación son mielitis, encefalitis, meningitis e infartos cerebrales, la fiebre no suele presentarse en la mayoría de los casos (Deshayes S, Bonhomme J, de La Blanchardiere A 2015). En cuanto a los principales signos clínicos observados podemos describir cambios conductuales, convulsiones localizadas y generalizadas, ataxia, alteraciones sensoriales, así como retención urinaria; en algunos casos, se han reportado disfunciones cognitivas y alteraciones en la memoria a corto y largo plazo (Hill IR, Denham DA, Scholtz CL. 1985).

La mayoría de los casos reportados describen el síndrome en adultos con un promedio de edad de 42 años y en un 19% se observan casos en menores de 18 años (Vidal JE, Sztajnbok J, Seguro AC, 2003).

Las principales alteraciones macroscópicas que se reportan en la literatura en los cerebros afectados por neurotoxocariosis son hemorragias severas a partir del día 7 post-infección, no presentando diferencia significativa entre ambos hemisferios y localizándose principalmente en la corteza cerebral. Los cambios histológicos reportados en el cerebro de modelos experimentales afectados con *Toxocara canis* son malacia, hemorragias de leves a graves, presencia de microglia activada, acumulación de mielinofagocitos (gitter cells), inflamación axonal, desmielinización y daño estructural general. (Elisabeth Janecek, Andreas Beineke, Thomas Schnieder et al. 2014).

La literatura menciona que los sitios donde frecuentemente se recuperan el mayor número de larvas es en cerebelo, sin embargo algunos autores han mencionado que *Toxocara canis* tiene afinidad por el encéfalo (Celia Holland, H. V. Smith 2006) (C.H. Burren. 1972).

4.3.4 Diagnóstico

4.3.4.1 Diagnóstico en el hospedero definitivo

El diagnóstico de *Toxocara canis* en el hospedero definitivo es relativamente sencillo en caninos menores de 6 meses que desarrollan la forma adulta intestinal. El proceso diagnóstico comienza con la anamnesis donde se incluyen los antecedentes epidemiológicos (desparasitaciones, geofagia, interacción con perros sin desparasitar, etc), así como la signología clínica relacionada con el compromiso del sistema digestivo posterior como: distensión abdominal, diarrea, anorexia, pérdida de peso, dolor abdominal, estreñimiento. Posteriormente el diagnóstico se confirma mediante la detección de huevos no embrionados característicos de *Toxocara canis* obtenidos de estudios coproparasitológicos utilizando el método por flotación (Fullerborn) o bien en algunos casos el directo (Nilda Ester Radman, Susana Mónica Archelli, Lola Burgos, *et al.*, 2006.)

Existe una iniciativa que ya fue patentada para identificar coproantígenos o incluso antígenos en sangre para el diagnóstico de *T. canis*, sin embargo se considera bastante confiable el estudio coproparasitológico para detectar la presencia de parásitos en los cachorros considerando la alta tasa de fertilidad del parásito (200,000 huevos excretados diarios por nemátodo). (Elsmore D., Flynn L 2015 & De la Fé P. , Duménigo B. , Brito E. , Aguiar J. 2006).

4.3.4.2 Diagnóstico en el hospedero paraténico y caninos mayores de 6 meses

En el hospedero paraténico es importante al igual que en el hospedero definitivo considerar los antecedentes, principalmente de pica y geofagia y conjuntarlos con la signología clínica. Todo individuo con eosinofilia (10,000 células/mm³) en sangre o con pérdida unilateral de la visión debe ser analizado

para *Toxocara canis* (Schantz, P. M., D. Meyer, L. T. Glickman. 1979), sin embargo, es importante considerar que en la toxocariosis encubierta y en pacientes con alergia en piel es posible encontrar eosinófilos en sangre por debajo de los valores promedio o incluso ausentes (Gavignet et al., 2008). Lo mismo puede aplicar en los casos de Larva Migrans Ocular donde una única larva ocasiona la patología y no es suficiente para alterar en gran medida la respuesta inmune (Gillespie, S.H., Dinning, W.J., Voller, A., et al., 1993). Sin embargo, hay algunos autores que reportan eosinofilia en el humor vítreo, lo que junto con la sintomatología y signología podría apoyar un diagnóstico integral (Liotet et al., 1992). Otro aspecto característico es la detección de inmonoglobulinas del tipo E que se han descrito en la mayoría de las helmintiasis, en el caso de toxocariosis se ha detectado un aumento de IgE específicas para *Toxocara canis* en el 79% de los pacientes, que suelen decaer entre los 4 y 6 meses post-tratamiento (Magnaval et al., 1994).

El uso de métodos indirectos es básico en el diagnóstico de la toxocariosis en el hospedero paraténico dado que en éstos no se desarrollan etapas adultas que excreten huevos que puedan ser visualizados en heces.

El método con más relevancia es el estudio inmunoserológico mediante un ensayo inmunoenzimático, principalmente tests de ELISA que utilizan antígenos de excreción/secreción de larvas de *Toxocara canis* que detectan anticuerpos IgG en suero, líquido cefalorraquídeo y humor vítro del individuo afectado, a pesar de aportar una sensibilidad de 80 y 100% y una especificidad de 90 a 95% es necesaria la caracterización de todos antígenos de excreción/secreción que la larva secreta en diferentes estados de la enfermedad. (De Savigny DH, Voller A, Woodruff AW. 1979 & Magnaval JF, Glickman LT, Dorchies P, et al.. 2001). Sin embargo se ha reportado que los anticuerpos IgG permanecen constantes durante toda la infección de *Toxocara canis* así como después del tratamiento, por lo que es posible obtener resultados positivos aún cuando el parásito ya abandonó el cuerpo del paciente, una propuesta que Dziemian y colaboradores han realizado es analizar la avidéz de las inmunoglobulinas G para relacionarlo con la cronicidad

de la infección (Dziemian E, Zarnowska H, Kołodziej-Sobocińska M, *et al.* 2008.)

Una desventaja de este método es la posible reacción cruzada con otras parasitosis como ascariosis, estrongiloidosis, triquinelosis, fasciolosis y otras helmintosis por lo que puede ser necesario confirmar el diagnóstico mediante inmunoblot que evita esta reacción cruzada fragmentando los antígenos de excreción/secreción de la larva de *T. canis* en bandas de 24kDa y 35kDa. (Pawlowski Z. 2001. & Magnaval JF, Fabre R, Maurières P, Charlet JP, *et al.* 1991).

El uso de imagenología ha sido descrito para identificar los granulomas característicos en los tejidos afectados que remiten tras el tratamiento antihelmíntico, sin embargo éstas técnicas carecen de especificidad, pero son una herramienta útil en el seguimiento de la enfermedad, así como al inicio del diagnóstico que pudiera ayudar a sugerir un diagnóstico presuntivo (Pawlowski Z. 2001)

En cuanto al uso de biología molecular se ha propuesto utilizar la técnica de PCR utilizando primers que amplifiquen regiones específicas de la larva migratoria, como el gen específico ITS2 (situado en la subunidad pequeña ribosomal) de lavados bronquiales o de biopsias de tejidos para diferenciar los posibles agentes etiológicos que pudieran desarrollar los síndromes antes descritos, sin embargo esta técnica no ha sido utilizada con éxito refiriendo baja sensibilidad (Li MW, Lin RQ, Chen HH, *et al.* 2007).

Se han logrado utilizar antígenos recombinantes principalmente provenientes de una glicoproteína de la pared de la larva que aportan una excelente sensibilidad y especificidad así como el desarrollo de la combinación de varios de éstos antígenos en pruebas inmunodiagnósticas (rTES-26, rTES-30USM y el rTES120) (Mohamad S, Azmi NC, Noordin R. 2009).

Las larvas de *Toxocara canis* son sumamente móviles en medios acuosos y tejidos por lo que la visualización directa de larvas migratorias en biopsias de

líquido cefalorraquídeo y humor vítreo es posible y en los tejidos afectados se puede confirmar la infección somática, sin embargo, este método se considera sumamente invasivo y en algunas ocasiones difícil de realizar (Eberhardt et al., 2005 & de Souza and Nakashima, 1995).

4.3.5 Tratamiento

La duración del tratamiento se relacionará con la gravedad de la enfermedad y quedará al criterio del médico que atienda el caso, sin embargo el tratamiento clásico de elección actualmente es el albendazole en dosis de 10mg/kg dividido en dos dosis diarias por 5 días que puede incrementarse hasta 400mg/kg diariamente. En caso de reacción adversa es posible utilizar mebendazol en dosis de 1 g diario por hasta 21 días, sin embargo este antihelmíntico no suele absorberse bien en el intestino por lo que se utiliza como segunda opción. La terapia sintomática será importante, por lo que administrar antiinflamatorios esteroidales será básico para controlar la excesiva respuesta inflamatoria hacia el parásito. La cirugía puede ser una opción en los casos de LMO o donde el tejido comprometido haya sido dañado de manera irreparable (Small, K. W., B. W. McCuen, E. De Juan, R. Macheimer. 1989 & Hotez, P. J. 1995.).

4.4 Epidemiología de *Toxocara canis*

La enfermedad de *Toxocara canis* se encuentra distribuida en todo el mundo, considerándose endémica en América, África y Asia, teniendo distribuciones de hasta 99.4% (Barriga, 1988; Heymann & American Public Health Association, 2004; Manson *et al.*, 2003). La siguiente tabla extraída de GIDEON muestra a nivel mundial la distribución de *T. canis* en función de endémica (cuadro verde), no endémica (cuadro blanco), casos esporádicos (cuadro amarillo) países en los que se han publicado estudios de prevalencia y/o seroprevalencia (punto rojo) (Overgaauw, 1997).

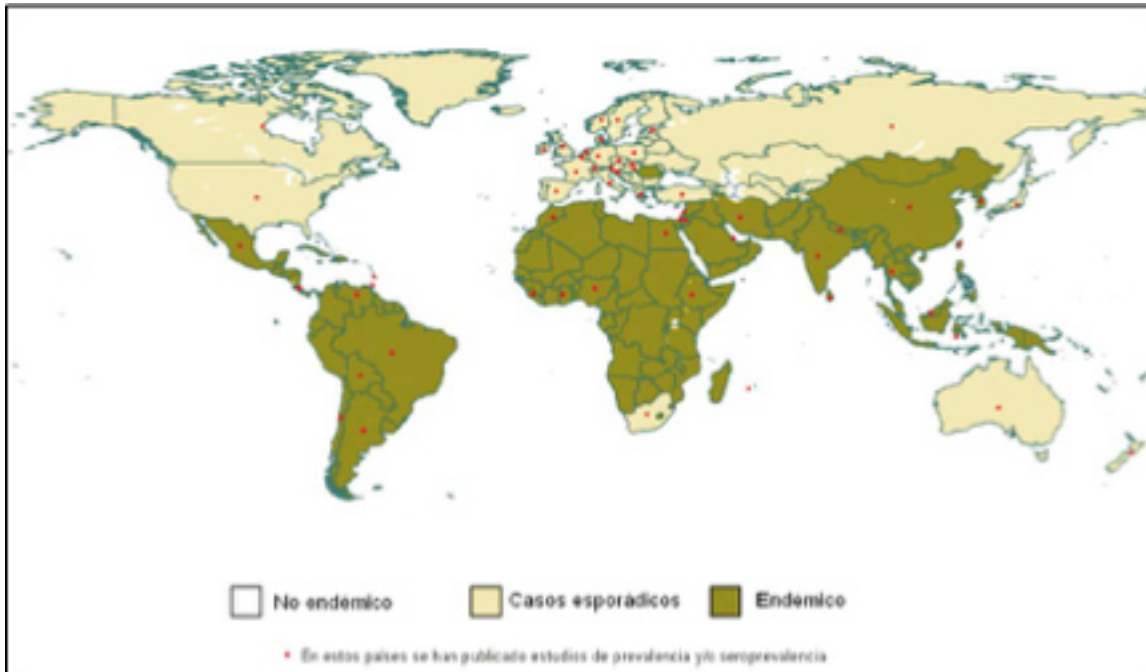


Figura 4. Distribución mundial de *Toxocara canis* Fuente: GIDEON, <http://www.gideononline.com/> (2007).

Olinda Delgado y colaboradores realizaron una revisión en el 2009 de diferentes estudios de prevalencia en Latinoamérica siendo algunos de los resultados más representativos los mostrados en la siguiente tabla:

País	Dato	Fuente
Argentina	9% a 19% de perros infectados con <i>T. Canis</i> en Gran Buenos Aires (1999)	(Rubel <i>et al.</i> , 2003)
Bolivia	Seroprevalencia: 27% en población general, Mora, y 42%, Zanja Honda, Santa Cruz (1998)	(Cancrini <i>et al.</i> , 1998)
Brasil	39.0% de perros y 29.7% de muestras de suelo, San	(Muradian <i>et al.</i> , 2005)

	Remo, Sao Paulo (2005)	
Chile	19.0% de perros y 65.1% de gatos en la base del río Valdivia (1987)	(Torres <i>et al.</i> , 1995)
Colombia	Prevalencia: 2.5% de perros (2005)	(Giraldo <i>et al.</i> , 2005)
Costa Rica	Prevalencia: 7% de muestras fecales de parques y playas públicas (2007)	(Paquet-Durand <i>et al.</i> , 2007)
Cuba	Prevalencia: 17.9% de perros (1994)	(Dumenigo <i>et al.</i> , 1994)
Ecuador	Prevalencia: 8,5%, muestras fecales de bovinos, Provincia de Azuay (1996-1997)	(Narvaez <i>et al.</i> , 2002)
Perú	Prevalencia de 80.3% en Amarilis (2000)	(Rafael, 2000)
Puerto Rico	Seroprevalencia en humanos 6.5% de la población de todas las edades (1980)	(Berrocal, 1980)
Trinidad	62.3% de prevalencia en escolares en Trinidad, edad de 5 a 12 años.	(Baboolal & Rawlins, 2002)
Venezuela	11.4%, perros en Maracaibo (2004)	(Ramirez-Barrios <i>et al.</i> , 2004)

Tabla 1. Estudios variados de prevalencia de *T. canis* en Latinoamérica. (Basado en la revisión realizada por Olinda Delgado & Alfonso J. Rodríguez-Morales en 2009).

En México se han reportado estudios de prevalencia que van desde el 12% hasta el 21.5% en perros de la ciudad de México (Eguia-Aguilar et al., 2005 & Ponce-Macotella et al., 2005) y hasta 60.5% de parques contaminados por huevos de *Toxocara canis* (Vasquez Tsuji et al., 1996).

Es importante considerar que la carga parasitaria en los perros disminuyen con la edad siendo los cachorros menores de 6 meses los animales más parasitados y los principales hospedadores que dispersan huevos en el ambiente contaminando los suelos (Acha et al., 2001), posiblemente debido al desarrollo de inmunidad específica contra el parásito (Delgado et al., 2000).

El síndrome de larva migrans visceral en humanos ha sido descrito en diferentes países como Estados Unidos de América, Australia, Sudáfrica, México, Argentina, distintas partes de Europa, Brasil, Colombia y Venezuela, y la presentación ocular ha sido reportada en Estados Unidos, Perú y Venezuela (Delgado O. & Rodríguez-Morales A. 2009).

4.5 Muerte celular

La muerte celular es un proceso biológico en el cual las células ya no realizan ninguna de sus funciones y sus mecanismos se detienen. La muerte celular puede deberse a un proceso organizado de reemplazo o de control celular o puede ocurrir debido a una lesión, enfermedad etc. El proceso de muerte celular continuará siempre y cuando la célula sobrepase una serie de procesos que componen una fase de “no retorno” o “no recuperación”, sin embargo este punto no ha sido del todo aclarado, ya que en un principio se relacionaba esta fase con la liberación masiva de caspasas, el aumento de la permeabilidad mitocondrial o la exposición de la fosfatidilserina sin embargo se ha visto que todos estos eventos se pueden revertir (Yang MY, Chuang H, Chen RF, et al. 2002, Cohen GM. 1997 & Garrido C, Kroemer G, 2004).

Sin embargo se pueden tomar ciertas características para definir que la célula ha muerto cómo la pérdida de la integridad de la membrana, la pérdida de la

definición de las estructuras celulares internas y la formación de vesículas con sus fragmentos y por último la fagocitosis de la célula por otra célula (Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, *et al.* 2005).

Existen diferentes procesos por los cuáles una célula puede morir; los ordenados y programados son la apoptosis y la autofagia, sin embargo existen otros métodos no apoptóticos de muerte celular como la necrosis, pyroptosis, pyronecrosis, etc (G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Vandenabeele, *et al.* 2009).

4.5.1 Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que se caracteriza por una serie de fenómenos ordenados que tienen como característica la condensación citoplasmática y la fragmentación de la membrana celular formando pequeños “cuerpos apoptóticos” que son fagocitados por células del sistema inmunitario, este proceso se caracteriza por no dañar el tejido adyacente y por limitar la respuesta inflamatoria al mínimo necesario (Lockshin, R. A., and Z. Zakeri. 2004).

La apoptosis es indispensable en los procesos de división celular y del ciclo de desecho celular natural, sin embargo también suele utilizarse como un mecanismo de defensa contra patógenos, principalmente intracelulares que pudieran representar un peligro para el sistema completo, su alteración se relaciona con enfermedades que se caracterizan por la replicación celular descontrolada como el cáncer (Danial NN, Korsmeyer SJ. 2004).

La apoptosis tiene dos mecanismos que se relacionan con la forma de ser activados, uno interno conocido como la vía intrínseca y otro conocido como la vía extrínseca (Locksley et al., 2001).

Vía intrínseca

La vía intrínseca se activa cuando existe daño dentro de la célula principalmente en el ADN o la activación de oncogenes y que son independiente de

receptores extracelulares. La mitocondria juega un papel fundamental en este proceso ya que será la encargada de liberar los componentes necesarios para activar el mecanismo de ejecución del suicidio celular (Conradt B, Xue D. 2005).

El proceso comienza con proteínas que son moduladas por p53 (principalmente las pertenecientes a la familia Bcl2: anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG, pro-apoptóticas Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, y Blk) que promueven o detienen el proceso de muerte celular programada ante una señal interna (producida por hipoxia, radiación, toxinas, infecciones virales, radicales libres, hipertermia etc.), si las proteínas que evitan la apoptosis (antiapoptóticas) se encuentran en mayor cantidad, el proceso de muerte se detendrá, sin embargo, si las proteínas que promueven la apoptosis (proapoptóticas) son más abundantes el mecanismo de suicidio celular continuará alterando la membrana interna de la mitocondria formando un poro transitorio (poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) que permitirá la salida al citosol del citocromo c, Smac/DIABLO, y la proteasa serina HtrA2/Omi (Garrido et al., 2005).

El citocromo C se unirá con Apaf-1 y con la procaspasa 9 para formar un complejo llamado "apoptosoma", esto (la adhesión de la procaspasa 9 al apoptosoma) activará la caspasa 9 (caspasa iniciadora) que se encuentra dentro del grupo de proteínas que activan las caspasas proteolíticas ejecutoras, mientras que Smac/DIABLO y HtrA2/Omi, promoverá la apoptosis inhibiendo las proteínas inhibitorias de la apoptosis (IAP's) (Hill et al., 2004). Una vez que las caspasas ejecutoras se activan, las proteínas pro-apoptóticas AIF, endonucleasa G, y CAD se liberan de la mitocondria y fragmentan el ADN y condensan la cromatina nuclear. (Susin et al., 2000).

Vía extrínseca

Esta vía a diferencia de la intrínseca depende de estímulos externos y principalmente de las interacciones de un grupo de receptores transmembranales

de muerte pertenecientes a la familia de factor de necrosis tumoral (TNF) que al unirse superficialmente mandan señales al interior de la célula para comenzar el proceso de muerte celular. Los receptores y los ligandos involucrados en la vía extrínseca son FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 y Apo2L/DR5 (Rubio-Moscardo et al., 2005).

La unión de los receptores con sus correspondientes ligandos (Fas/Fas o TNF/TNF) ocasiona la unión de la proteína FADD para Fas/Fas o TRADD para TNF/TNF activándola y reclutándola para unirse con la procaspasa 8 y formar el DISC (death-inducing signalling complex) que activará la caspasa 8 que generará una activación de las caspasas ejecutoras 3, 6 y 7 que finalizarán la apoptosis (Kischkel et al., 1995).

Fase de ejecución

La fase de ejecución comienza al activarse las caspasas ejecutoras 3, 6 y 7 que consecutivamente activarán las endonucleasas citoplasmicas y proteasas que degradarán el material nuclear y el citoesqueleto, éstas caspasas también interactuarán con diferentes sustratos como citoqueratinas, PARP, el citoesqueleto, proteínas nucleares, entre otras que causarán los cambios morfológicos característicos de la apoptosis (Slee et al., 2001).

Diagnóstico de apoptosis por el método de TUNEL

Existen diferentes formas de diagnosticar la apoptosis basados en los cambios celulares y moleculares que ocurren durante todo el proceso. Es posible analizar la alteración de genes de la familia Bcl2 relacionados con la ruta intrínseca por medio de PCR o ensayos inmunológicos, se puede utilizar Anexina V para que se una a la fosfatidilserina que se trasloca a la membrana exterior al iniciar la apoptosis y visualizarla con microscopía fluorescente etc (Xhang, G. and Gurlu, V. (1997).

La apoptosis es un proceso controlado y la fragmentación del ADN en

unidades nucleosomales de 180 a 200 pb pueden ser marcadores característicos de este proceso que se observa como una “escalera” que puede ser visualizado por medio de electroforesis. Estos métodos de diagnóstico son dependientes de una muestra con un gran número de células que estén pasando por el proceso de apoptosis, por lo que su sensibilidad es muy limitada. (Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben-Sasson, S. A. (1992).

Para poder identificar células individuales en apoptosis se utiliza la técnica de TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling) uniendo nucleótidos marcados con un cromóforo al extremo terminal de la cadena de ADN degradado utilizando una polimerasa TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferasa) pudiendo observarse las células con ADN fragmentado, cambio característico del proceso de apoptosis. Esta técnica tiene además la ventaja de poder identificar células apoptóticas individuales y puede realizarse en cortes histológicos (Zhang, Z. and Galileo, D. (1997) & Mitra, G. (1996).

4.5.2 Autofagia

En la autofagia se forman autofagosomas formados por membranas que envuelven el material citoplásmico y se unen a los lisosomas donde el citosol hasta organelos completos son sometidos a las enzimas hidrolíticas para disponer posteriormente de las macromoléculas resultantes (Mizushima, 2011). Las vesículas formadas por el proceso de autofagia tienen doble membrana lo que ayuda a diferenciarlas de otros procesos que ocasionan formaciones similares como los cuerpos apoptóticos (Tasdemir E, Galluzzi L, Maiuri MC, *et al.* 2008.

La autofagia depende de la actividad de las proteínas ATG. A diferencia de la apoptosis en la autofagia no sucede la condensación de la cromatina, hay una excesiva formación de vesículas en el citoplasma y no hay intervención de fagocitos. Se considera que este proceso promueve la supervivencia de la célula y se relaciona principalmente con el envejecimiento y la desnutrición (Baehrecke EH. 2005).

4.5.3 Necrosis y necroptosis

A diferencia de la apoptosis, morfológicamente la necrosis se caracteriza por hinchazón de la membrana celular y de los organelos que termina en la ruptura y liberación de su contenido al medio. Actualmente existe una controversia de términos al utilizar necrosis, ya que se consideraba un fenómeno accidental no regulado y espontáneo sin embargo existen evidencia que la necrosis es un evento altamente regulado por mecanismos específicos y catabólicos que utilizan dominios de muerte como TNFR1, Fas/CD95 and TRAIL-R y receptores Toll-like (3 y 4) en presencia de las caspasas inhibitorias (Golstein P, Kroemer G. 2007). Se ha observado un papel preponderante en eventos necróticos de las cinasas, particularmente RIP1 y en diferentes ensayos se ha comprobado que el fenómeno puede ser inhibidos si se inhibe la participación de RIP1 (Degterev A, Hitomi J, Gemscheid M, et al. 2008).

Los eventos específicos que llevan a una célula a morir por necrosis aún no están del todo claro, sin embargo se sabe que la alteración de la permeabilidad de la mitocondria, la producción de especies reactivas de oxígeno, alteración de permeabilidad de lisosomas, cambios nucleares mediante la hiperactivación de PARP-1 y la hidrólisis de NAD, la degradación de lípidos y el aumento del calcio en el citosol activa las proteasas que no son dependientes de caspasas, etc.(G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Vandenabeelle. Et al. 2009).

4.5.4 Pyroptosis

La pyroptosis es una forma de muerte celular que se caracteriza por ser dependiente de la activación de la caspasa 1, así como estar relacionada con una respuesta inflamatoria importante. La caspasa 1 será la responsable de activar las interleucinas 1 y 18 para formar citocinas inflamatorias, además de promover la ruptura de la membrana celular y la posterior liberación del contenido celular al

medio que también promoverán la inflamación (Bergsbaken, T., Fink, S., Cookson, B. 2009).

4.6 Apoptosis y parásitos

Los parásitos han evolucionado y han desarrollado mecanismos para inducir o evitar la apoptosis para lograr sobrevivir, cuando la apoptosis sucede en etapas tempranas favorece a la destrucción de parásitos intracelulares así como a la penetración del parásito, cuando la apoptosis sucede en etapas tardías favorece al hospedador evitando la respuesta inflamatoria excesiva sin embargo permite al parásito continuar la migración sin ser detenidos por el sistema inmune (Bienvenu, A. Gonzale E., Picot, S. 2010).

Se han reportado diferentes eventos relacionados con la apoptosis en infecciones parasitarias, especialmente protozoarios. Se ha analizado en modelos caninos el efecto del protozoario *Trypanosoma cruzi* en células del sistema inmunológico del corazón reportando un incremento excesivo de la apoptosis en linfocitos y miocitos infectados y no infectados, las infecciones experimentales en ratones demuestran una fuerte apoptosis de linfocitos T, CD4 y CD8 del bazo (Zhang J, Andrade ZA, Andrade S, *et al.* 1997).

Alderson MR y colaboradores en 1995 determinaron la participación de la vía extrínseca (FAS) en la regulación de la apoptosis de los linfocitos CD4 y concluyeron que un aumento de la unión del ligando Fas promueve la apoptosis de los linfocitos T y aumenta la replicación del parásito y un bloqueo de esta unión reduce la capacidad de replicación del protozoario, (Nunes MP, Andrade RM, Lopes MF & DosReis GA 1998).

Otros estudios han comprobado que moléculas aisladas del parásito pueden promover la apoptosis de células CD4 así como de macrófagos infectados facilitando la replicación parasitaria y la liberación de formas infectantes intracelulares (Freire-de-Lima CG, Nunes MP, Corte-Real S, *et al.* 1998).

Otro parásito que ha sido estudiado y en el que se ha comprobado su efecto como inductor de apoptosis en células CD4 es el protozooario *Toxoplasma gondii*. Se ha sugerido que la dispersión del parásito se debe principalmente a la inducción de la apoptosis de macrófagos mediante la vía del ligando Fas (Hisaeda H, Sakai T, Ishikawa H, *et al.* 1997).

En relación a *Leishmania donovani* se ha reportado que en contraste con *T. cruzi* y *T. gondii* la leishmania inhibe la apoptosis de los macrófagos infectados mediante la producción de GM-CSF gracias al lipofosfoglicano del parásito, esto asegura la supervivencia intracelular del protozooario (Moore KJ & Matlashewski G, 1994).

Se han descrito los eventos que suceden en el sistema nervioso central de un hospedador infectado por parásitos, en estos estudios se reporta apoptosis en las células endoteliales (inducido por factores derivados del parásito TAF) que alteran la permeabilidad de la barrera hematoencefálica lo que permite el paso del parásito hacia el sistema nervioso central. En infecciones cerebrales de malaria se han descrito los principales daños ocasionados por las hemorragias y el edema perivascular sin embargo también se ha analizado el daño axonal mediante los niveles de la proteína tau y S-100B concluyendo que los axones son sumamente susceptibles a daño por isquemia .Los déficits cognitivos se han relacionado principalmente con la apoptosis de astrocitos y microglia (Medana IM, Idro R, Newton CR: 2007.)

En ratones infectados experimentalmente, se ha detectado en etapas terminales de la enfermedad daño neuronal identificado por la técnica de TUNEL, también existe una correlación entre la identificación de la caspasa 3 activada y la severidad de los signos clínicos (Lackner P, Burger C, Pfaller K, *et al* 2007).

En infecciones cerebrales con *Trypanasoma brucei* también se ha descrito desmielinización neuronal, meningoencefalitis y apoptosis en el cerebelo (Quan N, Mhlanga JD, Whiteside MB, *et al.* . 1999).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención de huevos larvados de *T. canis*

Para la colección de huevos de *T. canis* se realizó un muestreo sistemático durante 6 meses en diferentes centros de control canino del área metropolitana de Monterrey (Monterrey, San Nicolás de los Garza, Escobedo Garza García y San Bernabé). Durante este periodo se diseccionó la porción del duodeno y yeyuno de cadáveres de chachorros en búsqueda de nemátodos adultos de *Toxocara canis*, la identificación se realizó inicialmente al momento de la colección por la morfología macroscópica general seleccionando solo aquellos mayores de 6 cm, los nemátodos seleccionados fueron depositados en frascos sellados que contenían solución salina y almacenados a 4°C por no más de 48 horas para su posterior identificación. Los nemátodos colectados fueron posteriormente lavados con una solución compuesta de solución salina y cloro con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de contaminantes y residuos, a continuación fueron sexados bajo un estereoscopio (Zeigen 2040-S) identificando la presencia del poro genital en la porción media de las hembras y la espícula en la porción distal en el caso de los machos, seleccionando únicamente a las hembras y desechando a los machos. Los nemátodos hembras seleccionados fueron sometidos nuevamente a tres lavados con la solución clorada antes descrita y puestas bajo el estereoscopio para diseccionarlas con el objetivo de extraer los huevos no embrionados directamente de la porción anterior del útero donde se encuentran las etapas más desarrolladas. Los huevos obtenidos fueron centrifugados a 2000 rpm por 2 minutos con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de residuos provenientes de la disección y posteriormente almacenados en cajas de cultivo celular en una solución de NaOH al 1% para ser incubados a 30°C con agitación cada tres días hasta obtener el 80% de huevos viables en etapa de larva 2. La determinación de la etapa se determinó mediante la visualización de los huevos bajo un microscopio de campo claro utilizando como criterio el desarrollo completo, el tamaño y la motilidad de la larva dentro del huevo.

5.2 Establecimiento del modelo de neurotoxocariosis

Para lograr establecer un modelo de neurotoxocariosis se procedió a realizar una infección experimental vía oral con el objetivo de emular una infección natural por medio de la ingestión de la etapa ambiental de *Toxocara canis* (huevo embrionado con larva en etapa 2).

Para lograr la migración a cerebro se administró una dosis única de 2500±50 huevos en etapa de larva 2. Para preparar la dosis infectante los huevos fueron sometidos a 2000 rpm por 3 minutos tres veces, eliminando el sobrenadante y conservando el sedimento con el objetivo de eliminar la solución de cultivo de NaOH al 1%, posteriormente, los huevos identificados en el sedimento fueron concentrados y re suspendidos en solución fisiológica. Los huevos fueron contabilizados por medio de cámara de McMaster para obtener dosis de 2500±50 huevos embrionados suspendidos en 1ml de solución fisiológica.

Para desarrollar el modelo experimental de neurotoxocariosis se utilizaron ratones machos de la cepa balb/c libres de patógenos de 12 semanas de edad, divididos en 3 grupos de 10 animales cada uno. El primer grupo se consideró el grupo control, a este grupo se le proporcionó agua y alimento ad libitum, el segundo grupo fue sometido al primer tratamiento que consistía en la administración de la solución fisiológica utilizada para suspender los huevos por vía oral utilizando una sonda endogástrica, por último el tercer grupo fue sometido al tratamiento 2 que consistía en la administración de la dosis infectante de 2500±50 huevos embrionados (larva 2) suspendidos en 1ml de solución fisiológica por vía oral utilizando una sonda endogástrica rígida. Todos los animales fueron sometidos durante 15 días antes del día de la administración de los tratamientos (día 0 ó día de la infección) a un proceso de habituación y condicionamiento donde diariamente eran manipulados con el objetivo de simular el manejo necesario para la administración de los tratamientos y posteriormente eran alimentados, con el objetivo de minimizar el estrés y las variables que pudieran interferir en el resultado del experimento como consecuencia del mismo. Los tres grupos fueron mantenidos durante 21 días post-tratamiento en condiciones constantes de

temperatura, humedad y con temporizador adecuado para proveer 8 horas de oscuridad, así como alimentación y agua *ad libitum*. Los ratones fueron distribuidos en grupos de 5 animales por jaula para minimizar el estrés social, la cama de los animales era cambiada dos veces por semana, y se les proveyó enriquecimiento ambiental en forma de vasos y túneles. Este protocolo de manejo fué revisado y aprobado por el Comité de Bioética y Bienestar animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL.

5.3 Identificación de larvas migratorias en cerebro por medio del método de compresión tisular

Los tres grupos fueron sacrificados 21 días post-tratamiento, con el objetivo de minimizar el dolor, el estrés y la ansiedad del proceso se comenzó con una insensibilización mediante la administración inhalada de éter en un receptáculo cerrado y sellado y una vez inconsciente se procedió al proceso de eutanasia siguiendo los criterios establecidos por la NOM-062 mediante la dislocación cervical.

Posteriormente se separó la cabeza de la columna realizando un corte a nivel del foramen magno separando el cráneo del atlas y las demás estructuras (músculo y piel) que las mantienen unidas. Para lograr extraer de manera íntegra el encéfalo y el cerebelo se procedió a desprender la piel y a separar los planos musculares que recubren el cráneo. Posteriormente se realizó un primer corte desde el foramen magno hasta la altura del temporal cercana a la base de la oreja, a continuación se realizó un segundo corte hasta la apófisis cigomática del frontal y para finalizar se cortó hasta la sutura inter frontal en dirección lateral, el hueso seccionado se retira, se incide en las meninges y se procede a liberar el encéfalo, el cerebelo y parte del tallo cerebral cortando los nervios ópticos y desprendiéndolo de las demás estructuras que lo mantienen adherido dentro del cráneo.

Una vez obtenido la totalidad del sistema nervioso central, como primer paso se procedió a obtener pequeñas porciones del lóbulo frontal, de ambos temporales, del lóbulo occipital, del parietal, del cerebelo y del tronco encefálico. El tejido obtenido se homogenizó hasta obtener de .1 a .2 gr de muestra y se procedió a realizar la compresión tisular mediante la localización del tejido entre dos placas de vidrio y la aplicación de fuerza de compresión para posteriormente visualizarse en un triquinoscopio con el objetivo de identificar larvas migratorias de *Toxocara canis*.

El resto del órgano fue seccionado longitudinalmente en dos partes iguales, una de la mitades fue fijada en formaldehído bufferado al 10% para estudios histológicos y la mitad restante fue congelada a -60°C para estudios moleculares posteriores.

5.4 Obtención de ARN total de tejido cerebral animal por medio de un sistema de extracción y purificación por columnas

Se realizó la extracción de ARN de las muestras de tejido cerebral por medio la técnica de extracción y purificación por columnas para garantizar la obtención de un ARN de calidad utilizando el kit Z-10 Spin Column Animal Total RNA Mini- Preps Kit del fabricante Bioline (Londres, Inglaterra).

Inicialmente se procedió a pesar el tejido hasta obtener una muestra de 25 gramos que fue homogenizada en un mortero con mano, la muestra fue después depositada en un tubo de 1.5 ml libre de RNA-asas en el cual se agregó 350 µl del Buffer Rlysis-AG y se comenzó a mezclar de inmediato mediante inversión con el objetivo de comenzar el proceso de lisis celular. Para asegurarse de que todas las células en la muestra sufrieran lisis se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió la mitad del volumen de etanol y se volvió a mezclar por inversión para a continuación depositando el producto en una columna para centrifugar por 30 segundos a 12,000 rpm. A continuación se

eliminó el sobrenadante y se añadió 0.5 ml de la solución Universal GT a la columna para ser centrifugado por 30 segundos a 12,000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante fué eliminado y a continuación se añadieron .5 ml de la solución Universal NT a la columna y se centrifugó por 30 segundos a 12,000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante fue nuevamente desechado y se centrifugó por 30 segundos a 12,000 rpm, después de este paso el tubo de 1.5 ml libre de RNA-asas utilizado es eliminado y se reemplazó por uno nuevo donde se ubicó la columna y se añadieron 50 µl de agua libre de RNA-asas, se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó por última vez a 12,000 rpm por 1 minuto. La columna fue desechada y el producto se almacenó a -80°C.

El ARN resultante fue cuantificado mediante la utilización de un espectrofotómetro (EPOCH Biotek) y la determinación de la calidad e integridad del ARN obtenido se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer SB1X por 30 minutos a 45mA.

5.5 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Debido a la alta sensibilidad del ARN todo el procedimiento se realizó manejando los reactivos en hielo. Para la obtención del ADNc complementario se utilizó el kit de síntesis Sensi Fast cDNA Synthesis kit (Bioline). Para comenzar el proceso de síntesis de ADNc se comenzó por obtener el volumen necesario para obtener 5 µg de ARN utilizando los datos obtenidos previamente en la cuantificación por medio de espectrofotometría.

5 µg de ARN se mezclaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml con 4 µl de 5x TransAmp Buffer (dNTP's (10mM), Oligo dT (0-05µg/µl, RT 5X, 2µl de DTT (100Mm) e inhibidor de RNAsas), 1 µl de transcriptasa reversa y se aforó con agua libre de ARN/ADN-asas hasta obtener un volumen de 20 µl para ser mezclado con la micropipeta.

Posteriormente se procedió a procesarlo en el termociclador iniciando el protocolo con 25°C por 10 minutos para promover el alineamiento, a continuación

se somete a 42°C por 15 minutos para dejar actuar la transcriptasa reversa, 85°C para la inactivación y por último se enfría a 4°C por 35 ciclos para ser almacenado a -20°C.

5.6 PCR punto final para la identificación de *Toxocara canis* y análisis de la expresión del gen constitutivo B-actina y genes relacionados con la apoptosis (Bax, Bcl2, Bcl-XI, Bcl-Xs)

Para verificar la integridad del ADNc obtenido se analizó la expresión del gen constitutivo B-actina en cada una de las muestras utilizando como control positivo sangre de humano. Para esto se utilizó el kit de My Taq DNA Polimerasa (Bioline), cada reacción se conformó 1 µl de ADNc (25ng), 5 µl de buffer de reacción 5x MyTaq (5 mM dNTP's y 15 mM de MgCl₂, estabilizadores y potenciadores), 1 µl del primer R (25ng), 1 µl del primer F (25ng), .5 µl de My Taq DNA Polimerasa y 16.5 µl de agua DEPC con el objetivo de aforar a un volumen de 25 µl.

Una vez comprobada la integridad del ADNc se procedió a identificar la presencia de *Toxocara canis* por medio de PCR punto final, analizando la expresión del gen ribosomal ITS2 usando como control positivo ADN provenientes de larvas del parásito. Posteriormente se realizaron las amplificaciones de los genes relacionados con muerte celular programada (Bax, Bcl2, Bcl-XI, Bcl-Xs). Ambos procesos se realizaron utilizando los mismos criterios previamente establecidos para la amplificación del gen constitutivo utilizando un termociclador PCR CAP 96X0.2ml (Maxygene). La siguiente tabla muestra las secuencias de oligonucleótidos utilizadas en este estudio.

Oligonucleótidos utilizados para PCR		
GEN	SENTIDO	ANTISENTIDO
B-actina	GACTTCGAGCAAGAGAT	TCGTCAGCCTGCTTGCT
Toxocara	CGGTGAGCTATGCTGGTGTG	TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT
Bax	TGCAGAGGATGATTGCTGAC	GATCAGCTCGGGCACTTTAG
Bcl-2	TCATGTGTGTGGAGAGCGTCAA	GTGTGTGTCTGTCTGTGTGTGTGA
BclX	TTGGACAATGGACTGGTTGA	GTAGAGTGGATGGTCAGTG

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la Reacción en Cadena de la Polimerasa de B-actina, *Toxocara canis* y genes apoptóticos

Las condiciones utilizadas para la amplificación de cada uno de los genes antes mencionados se describen a continuación:

Gen	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	# ciclos	Fragmento (pb)
B-actina	94°C por 30 s	53°C por 35 s	72°C por 30 s	35	430
Toxocara	94°C por 30 s	55°C por 35 s	72°C por 30 s	35	330
Bcl-2	94°C por 30 s	60°C por 35 s	72°C por 30 s	35	422
BclX	94°C por 45 s	60°C por 45 s	72°C por 60 s	35	BclX _S 591 BclX _L 780
Bax	94°C por 30 s	60°C por 35 s	72°C por 30 s	35	173

Tabla 3. Condiciones utilizadas para la Reacción en Cadena de la Polimerasa de B-actina, *Toxocara canis* y genes apoptóticos

Los productos amplificados para los diferentes genes fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% a 90V por una hora y media y visualizados por medio de un transiluminador (Benchop UV Transilluminator Upland, CA. USA).

5.7 Identificación de la fragmentación de ADN sobre el tejido por medio de la técnica de TUNEL

La sección fijada se seccionó longitudinalmente con micrótopo obteniendo cortes de 6micras los cuales fueron montados en laminillas tratadas para obtener adherencia electroestática. Para desparafinar de manera adecuada y lograr una buena permeabilización, las laminillas se calentaron por 10 minutos en plancha a 57°C para posteriormente ser sumergidas en dos cambios de xileno por 5 minutos cada uno, posteriormente el tejido se hidrató por 5 minutos en cada uno de alcoholes al 100%, 95% y 70% y posteriormente se lavaron dos veces por 5 minutos con 1X PBS.

Para comenzar el proceso de marcaje el tejido se cubrió en su totalidad con cytonina durante toda la noche para permear la célula. Posteriormente se lavaron y se realizó el bloqueo de peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno al 30% y metanol. Después del lavado con PBS las muestras se sometieron al proceso de marcaje con TdT por dos horas y posterior tratamiento con estreptavidina y peroxidasa de rábano en cámara húmeda a 37°C. El producto se lavó y se sumergió en diaminobencidina por 7 minutos para después ser teñido con la tinción de contraste Methyl Green. Por último se procedió a los últimos lavados y al montaje con resina clara para su observación 24 horas después.

5.8 Análisis histopatológico de las lesiones en cerebro ocasionadas por la migración larvaria de *T.canis*

Las secciones que no fueron congeladas para su posterior procesamiento molecular fueron fijadas en formaldehído al 10% para detener las enzimas que promovieran la lisis celular para ser procesadas para su evaluación histopatológica. Después de la fijación fue necesario el lavado para evitar que el fijador interfiriera con la inclusión, por lo que procedimos a realizar un lavado y deshidratación sumergiendo el tejido en alcohol etílico de manera gradual y ascendente con concentraciones de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 60%, 80%, 90%, 95% y 100% con el objetivo de eliminar todo el agua sin deformar el tejido.

Posteriormente el tejido se aclaró sumergiéndolo en xilol para cambiar el índice de refracción y favorecer la tinción posterior.

A continuación se procedió a incluir el tejido en parafina para facilitar su seccionado y lograr cortes lo suficientemente delgados como para poder ser observados bajo el microscopio. Una vez embebidos en parafina se procedió a seccionarlos con un microtomo en cortes de 5 micras obteniendo tres juegos de cada muestra, para posteriormente ser montados sobre portaobjetos con solución de montaje (albúmina y glicerina).

Finalmente se procedió a teñir, iniciando con un proceso de desparafinado utilizando tres cambios de xilol por 5 minutos cada uno, hidratación utilizando alcoholes de manera gradual y decreciente para posteriormente teñir cada juego con Hematoxilina & Eosina, tinción de Mason y tinción de PAS, una vez teñidos se procedió a deshidratar con alcoholes y aclarar con xilol para finalmente adherir el cubreobjetos con resina transparente y poder visualizar los tejidos bajo el microscopio.

6. RESULTADOS

6.1 Obtención de huevos infecciosos de *T. canis* a partir de hembras adultas

Se establecieron vínculos con diferentes clínicas y centros de control canino (CCC) del área metropolitana para lograr obtener hembras adultas de *Toxocara canis* de cachorros naturalmente infectados. La recolección se llevó a cabo por 6 meses en el periodo Agosto-Diciembre 2013, los municipios participantes fueron Monterrey, San Nicolás de los Garza, Escobedo y San Bernabé. De igual forma se obtuvieron muestras de las heces de cachorros infectados con *Toxocara canis* reportados al laboratorio de parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia a los cuales se les administró el vermífugo piperazina. En total se recolectaron 44 nemátodos hembras. La relación de los casos remitidos y los nemátodos colectados fue la siguiente.

MUNICIPIO	CASOS REMITIDOS	ANIMALES INFECTADOS EN CCC	NEMÁTODOS HEMBRAS RECOLECTADOS
Monterrey	2	2	7
San Nicolás de los Garza	4	5	13
Escobedo	4	6	16
San Bernabé	3	3	8

Tabla 4. Relación de nemátodos adultos por municipio

Las lesiones identificadas en los intestinos de los individuos muestreados mostraban en la mayoría enteritis, meteorismo y en menos del 15% de los casos pequeñas hemorragias.

Un hallazgo paralelo fue la identificación de otros parásitos en el intestino de cachorros como *Dipilidium caninum*, *Ancylostoma caninum* y *Taenia spp.* que coincidían con la infección por *Toxocara canis* en casi el 50% de los casos.

Los nemátodos (*T. canis*) fueron procesados y se extrajeron los huevos directamente del útero de las hembras adultas (Fig.5). Los huevos fueron depositados para su cultivo inicialmente en cajas de Petri, sin embargo se observaba contaminación frecuente, por lo que se decidió utilizar cajas de cultivo celular para la incubación de los huevos disminuyendo la contaminación hasta en un 80%.

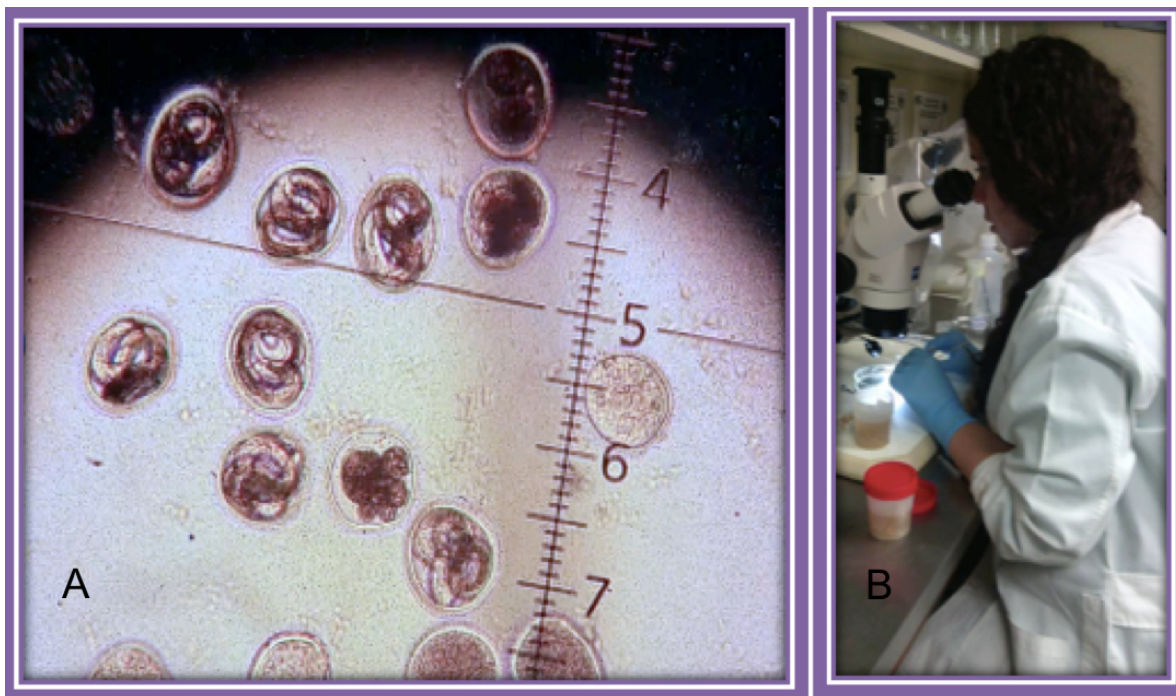


Figura 5. A) Huevos de *Toxocara canis* en etapa de Larva 2, B) Proceso de disección de nemátodos adultos bajo el estereoscopio

Los huevos depositados en cajas de cultivo celular (100,000 +/- 50,000 huevos por caja) fueron cultivados con dos medios de cultivo diferente, el primero de ellos una mezcla de solución salina y antibiótico antifúngico y el segundo consistió en una solución de hidróxido de sodio al .1%, siendo los huevos que fueron cultivados con antibiótico y solución salina más susceptibles a la contaminación, por lo que se decidió optar por realizar el cultivo en la solución de

NaOH .1% para conseguir los huevos en etapa de larva 2 para la dosis infectante (Tabla 5 y Figura 5).

MEDIO DE CULTIVO	CAJAS DE CULTIVO CELULAR CONTAMINADAS
Solución salina + antibiótico antifúngico	100%
Hidróxido de sodio al .1%	20%

Tabla 5. Comparación de contaminación con los medios de cultivo utilizados

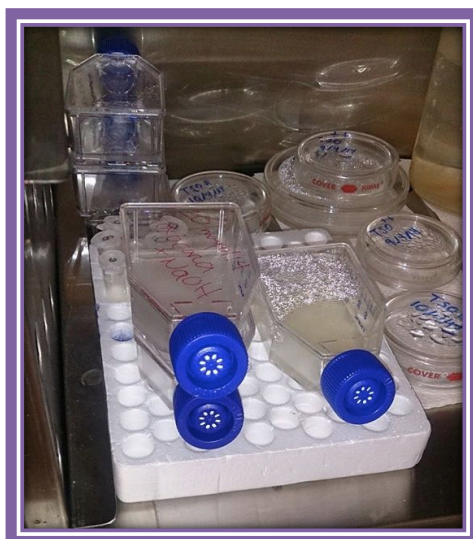


Figura 6. Cajas de cultivo de huevos con medio de cultivo de Hidróxido de sodio (izquierda) que no muestra contaminación y solución salina con antibiótico antifúngico (derecha) que muestra contaminación.

Los huevos fueron incubados a 27° con una humedad relativa constante de 70% hasta obtener el 80% de huevos en etapa de larva 2. Se obtuvieron diferencias significativas de tiempos de maduración de los huevos entre los diferentes lotes de cultivo. El siguiente gráfico plasma la diferencia de maduración de los huevos por lote:

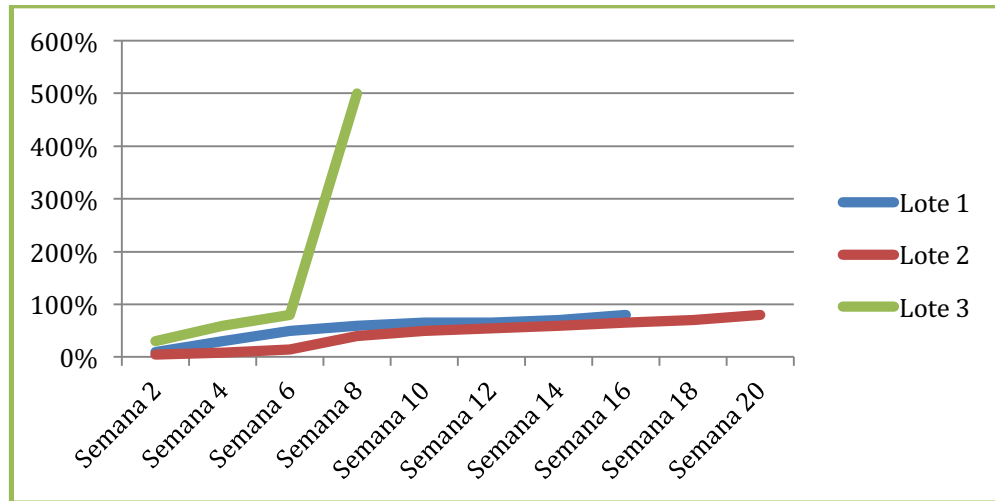


Gráfico 1. Comparación del periodo de maduración entre tres lotes de cultivo de huevos.

6.2 Establecimiento de un modelo de neurotoxocariosis con huevos larvados de *Toxocara canis*.

Los huevos embrionados fueron lavados y concentrados para obtener la dosis infectante de 2500±50 huevos, la viabilidad de los huevos fue determinada por la morfología, tamaño así como la observación de la motilidad de la larva dentro del huevo.

Los tratamientos fueron inoculados por vía oral utilizando una sonda endogástrica. Los animales fueron confinados en jaulas de acrílico estéril por 21 días en condiciones ambientales constantes (luz, temperatura, humedad, vibraciones) y con alimento y agua *ad libitum*. La zootecnia de los animales se realizó bajo las consideraciones estipuladas en la NOM-062-ZOO-1999.

Al día 21 post-tratamiento los 3 grupos fueron sacrificados utilizando éter como método de insensibilización y dislocación cervical como sacrificio, para posteriormente proceder a procesar los órganos para la detección de larvas migratorias de *Toxocara canis* (Fig.7).

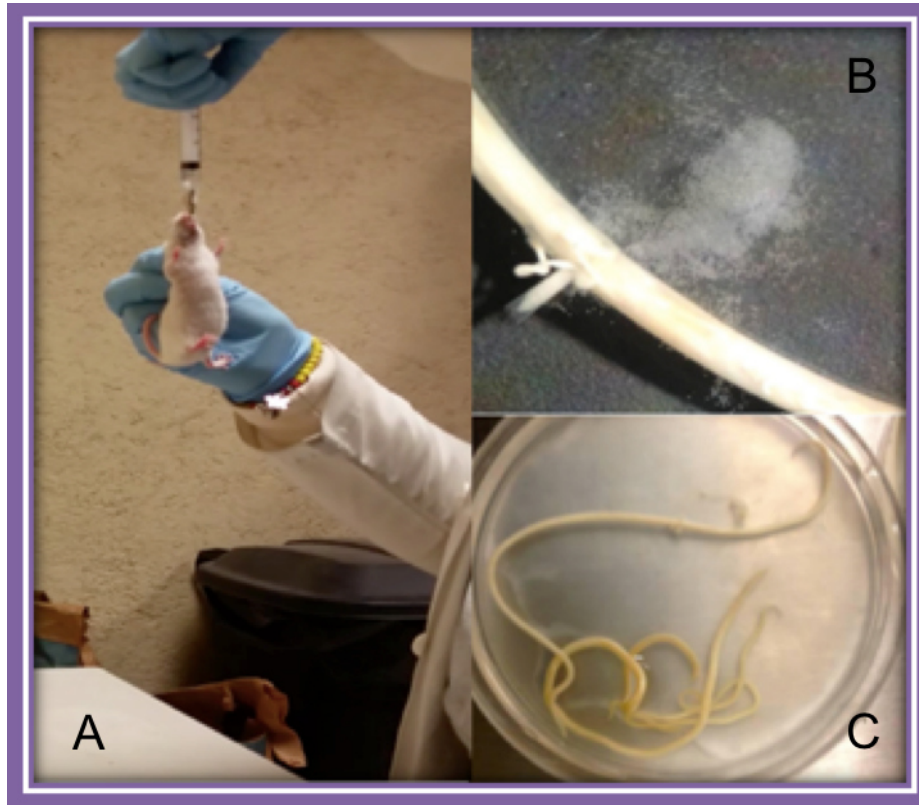


Figura 7. A) Inoculación intraoral, B) Disección de la porción anterior del útero de nemátodo (fuente: Flores Alejandra 2014.) C) Identificación de nemátodos (fuente: Flores Alejandra 2014.)

6.3 Identificación de larvas migratorias de *T. canis* por la técnica de compresión tisular

Los ratones fueron sacrificados humanitariamente bajo los criterios establecidos por la NOM-062.ZOO-1999 por dislocación cervical. El cerebro de los animales fue extraído y se tomaron muestras de diferentes áreas para procesarlos por compresión tisular. Al analizar la totalidad del sistema nervioso central no se observaron lesiones macroscópicas aparentes (Fig.8).



Figura 8. Extracción total del sistema nervioso central

Todos los animales del grupo 1 (infección con huevos larvados) presentaron migración somática a cerebro de larvas morfológicamente compatibles con larvas de *Toxocara canis*, observando larvas de 300-350 μ variando en el número de larvas encontradas con un promedio de 13 larvas por individuo. Se analizó la presencia de larvas en hígado, músculo y ojo y se obtuvieron menos cantidad de larvas en músculo e hígado que las identificadas en el sistema nervioso central y ausencia de larvas en tejido ocular. La siguiente tabla muestra la relación de número de larvas identificadas por órgano por individuo sometido al tratamiento:

Órgano	Ratón #1	Ratón #2	Ratón #3	Ratón #4	Ratón #5	Ratón #6	Ratón #7	Ratón #8	Ratón #9	Ratón #10
Cerebro	10	9	12	10	17	15	13	11	21	14
Ojo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Músculo	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Hígado	3	1	2	1	2	1	2	0	4	0

Tabla 6. Número de larvas encontradas en los diferentes órganos en el grupo infectado con huevos de *Toxocara canis*

La siguiente imagen muestra las larvas de *T. canis* observadas por compresión tisular en el tejido cerebral de los ratones infectados:

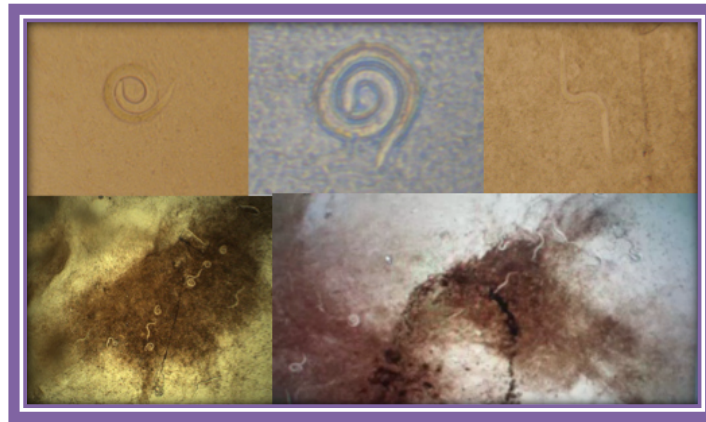


Figura 9. Larvas de *T. canis* observada por el método de compresión tisular en cerebro de ratón del grupo tratamiento.

Se sacrificaron ratones centinela a los días 6 y 15 previos al día 21 (eutanasia) y se encontró una correlación entre el periodo de infección y el número de larvas como puede observarse en el siguiente gráfico:

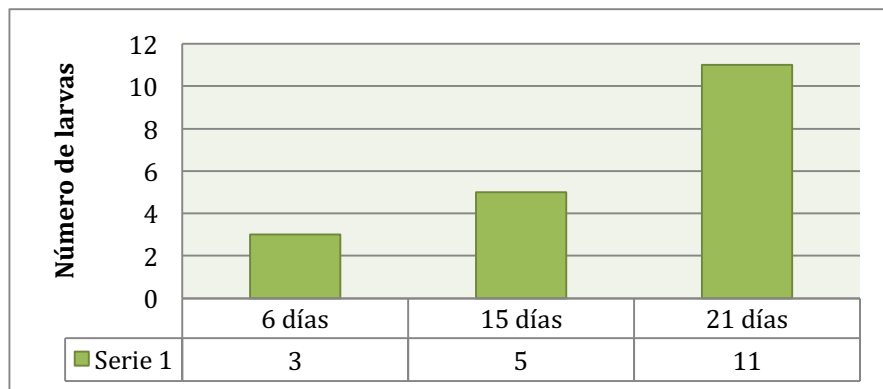


Gráfico 2. Número de larvas en cerebro encontradas en ratones centinela en relación con el periodo de infección

6.4 Amplificación del gen constitutivo b-actina e identificación molecular de *Toxocara canis*

Después del proceso de extracción de ARN total por la técnica de columnas se realizó una cuantificación por medio de un espectrofotómetro obteniendo cantidades en el rango de 181ng/μl a 754ng/μl, para la síntesis del ADNc, cuya integridad se verificó mediante la amplificación del gen constitutivo beta actina mediante PCR punto final. Inicialmente se trabajó con ADN de tejido cerebral de ratones control utilizando inicialmente el protocolo recomendado por la literatura con una temperatura de alineamiento de 63°C, sin embargo se obtuvieron una gran cantidad de bandas inespecíficas, por lo que se realizó un gradiente de temperatura hasta obtener las condiciones ideales de alineamiento, observando a 53°C un único fragmento claro de 430 pb (Fig.10)

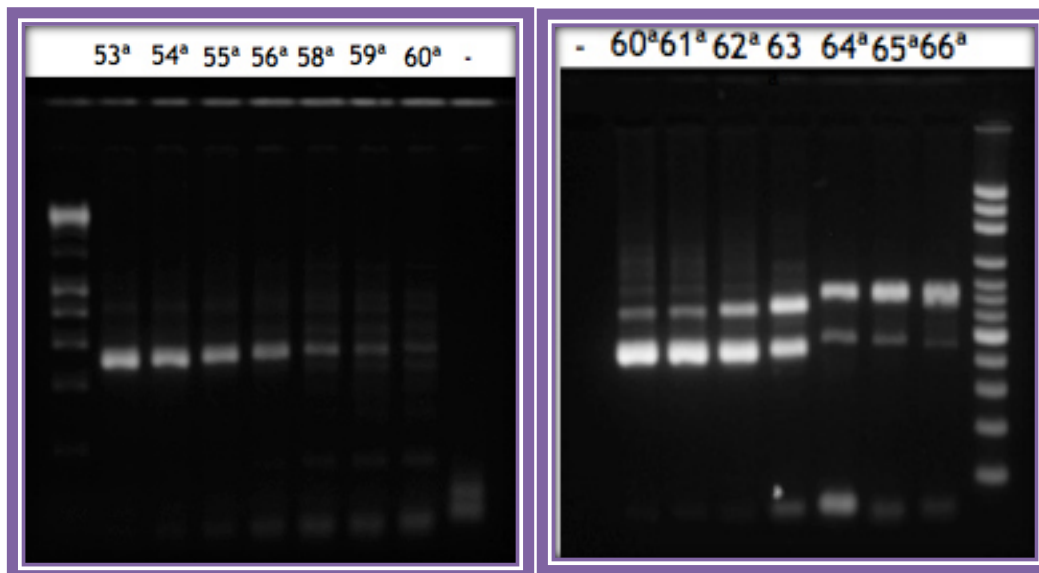


Figura 10. Gradiente de temperaturas para amplificación del gen de beta actina

Una vez obtenidas las condiciones adecuadas se puede comprobar la integridad de los ADNc de las muestras mediante la amplificación del gen constitutivo obteniendo en la totalidad de los grupos la banda esperada para B-actina de 430 pb.

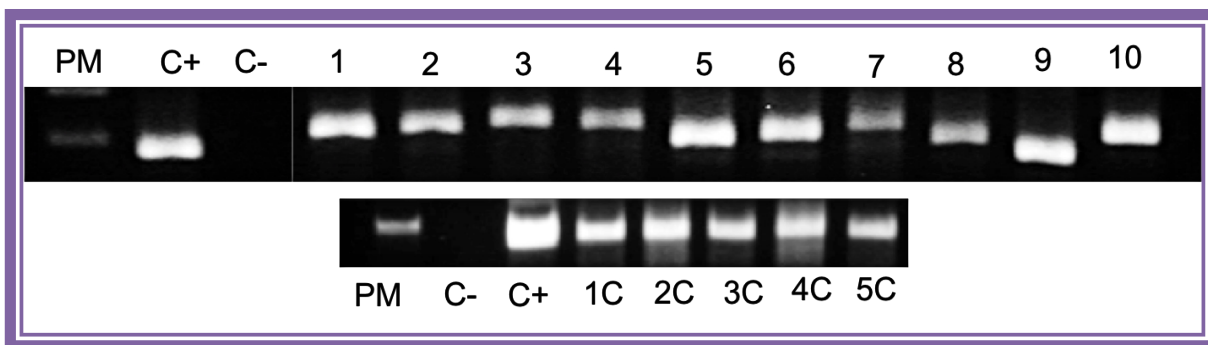


Figura 11. Amplificación de b-actina. Fragmento de 430 pb. PM: Peso molecular, C+: Control positivo, C-: Control negativo, 1-10 Grupo tratamiento, 1C-5C: Grupo Control.

Los productos de la electroforesis fueron analizados por el software de imágenes ImageJ para determinar cuantitativamente la intensidad de la banda. Los resultados del análisis cromatográfico se presentan en la siguiente tabla:

Muestra	Área	Porcentaje
1	28852.125	11.675
2	22048.125	8.922
3	20795.711	8.415
4	18613.66	7.532
5	35547.61	14.384
6	29669.539	12.006
7	16483.64	6.67
8	17733.64	7.176
9	29124.246	11.785
10	28262.054	11.436

Tabla 7. Resultados del análisis por densitometría de la amplificación del gen beta actina

Comprobada la integridad del ADNc se procedió a identificar la presencia de *Toxocara canis* en el cerebro de los individuos tratados mediante la amplificación del gen ITS2. La totalidad de los individuos que conformaban el grupo tratamiento resultaron positivos para la amplificación de un fragmento de 330 pb compatible con el fragmento deseado que confirmaría la presencia de

migración cerebral, los animales correspondientes al grupo control resultaron negativos a la identificación molecular de larvas migratorias de *Toxocara canis*.

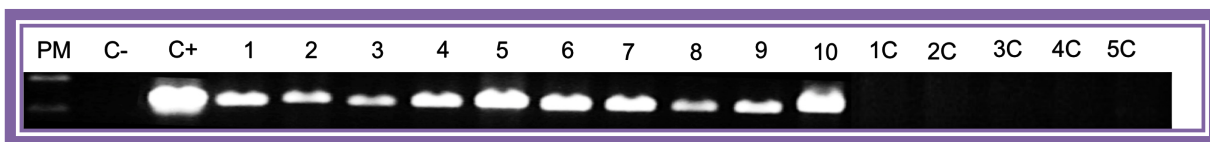


Figura 12. Amplificación del gen ITS2 para detección molecular de *Toxocara canis* en grupo tratamiento. PM: Peso molecular, C+: Control positivo, C-: Control negativo, 1-10: Grupo tratamiento, 1C-5C: Grupo Control.

El análisis de las bandas amplificadas del gen ITS2 se realizó mediante el software ImageJ, siendo los individuos 5 y 10 los que obtuvieron las mayores densidades, y el 3 y el 8 los que registraron las menores densidades.

Los resultados obtenidos del estudio por densitometría se observan en la siguiente tabla:

Muestra	Área	Porcentaje
1	34519.439	10.608
2	25006.024	7.684
3	19815.439	6.089
4	34412.731	10.575
5	49524.974	15.219
6	39170.731	12.037
7	34680.56	10.657
8	18068.075	5.552
9	24424.024	7.506
10	45791.903	14.072

Tabla 8. Resultados del análisis por densitometría de la amplificación del gen ITS2 de *Toxocara canis*

6.5 Análisis de la alteración de genes apoptóticos en ratones con neurotoxocariosis

Una vez confirmada la presencia de la larva de *Toxocara canis* en el cerebro de los individuos del grupo tratamiento por medio de la compresión tisular así como por diagnóstico molecular, se comenzó el análisis del impacto de la larva en la viabilidad celular del sistema nervioso central. Para esto se analizaron diferentes genes que juegan un papel importante en la determinación de comenzar o no un proceso apoptótico. Para este propósito se analizó la expresión de los genes proapoptóticos Bax, Bclx-S y los genes antiapoptóticos Bcl2 y Bclx-L.

En todos los individuos del grupo tratamiento se logró la amplificación de un fragmento de 173pb correspondiente al gen proapoptótico Bax, siendo los individuos 5, 6, 9 y 10 los que mostraban bandas con mayor intensidad.

Los animales control que no fueron infectados con huevos larvados resultaron con poca o nula amplificación del gen en cuestión, los individuos 1 y 3 del grupo control resultaron con una banda de baja intensidad para la amplificación del gen Bax. (Fig.13)

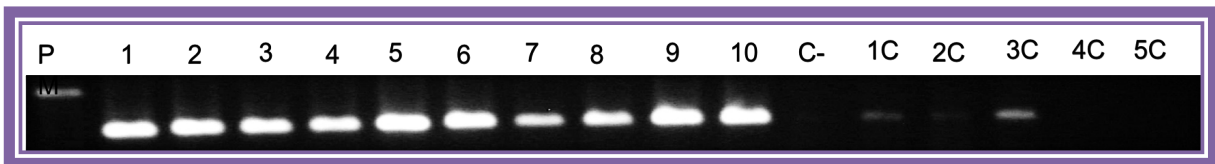


Figura 13. Electroforesis de los productos de amplificación para el gen Bax en grupo tratamiento y en el grupo control. PM: Peso molecular, C-: Control negativo, 1-10: Grupo tratamiento, 1C-5C: Grupo Control.

En comparación con Bax, con el gen antiapoptótico Bcl2 los resultados fueron más inconsistentes siendo solo los individuos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 y 10 positivos a la amplificación sin embargo con intensidad sumamente variable, siendo la amplificación en el individuo 4 casi inexistente y observándose la mayor intensidad de amplificación en los individuos 1 y 5, en el caso de los individuos

conformados por el grupo control no se observó amplificación del gen bcl2. (Fig 14).

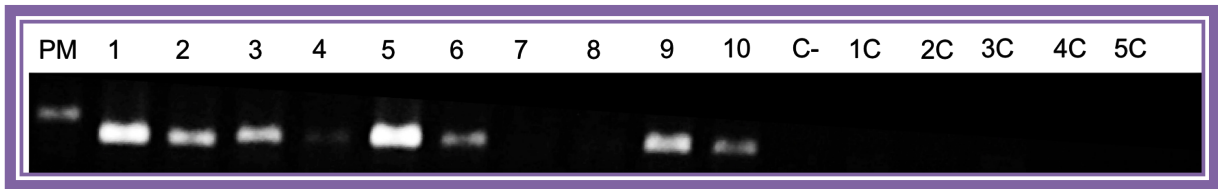


Figura 14. Electroforesis de los productos de amplificación para el gen Bcl2 en grupo tratamiento y en el grupo control. PM: Peso molecular, C-: Control negativo, 1-10: Grupo tratamiento, 1C-5C: Grupo Control.

Por último la amplificación para el gen Bclx resultó negativa en todos los individuos para su fragmento corto proapoptótico (Bclx-S), sin embargo para el fragmento largo de Bclx, los individuos 1, 5, 9 y 10 obtuvieron bandas de media a alta intensidad en comparación de los individuos 2, 3, 4 y 8 que obtuvieron resultados tenues a nulos para la amplificación del fragmento esperado de 700pb para Bclx-L.

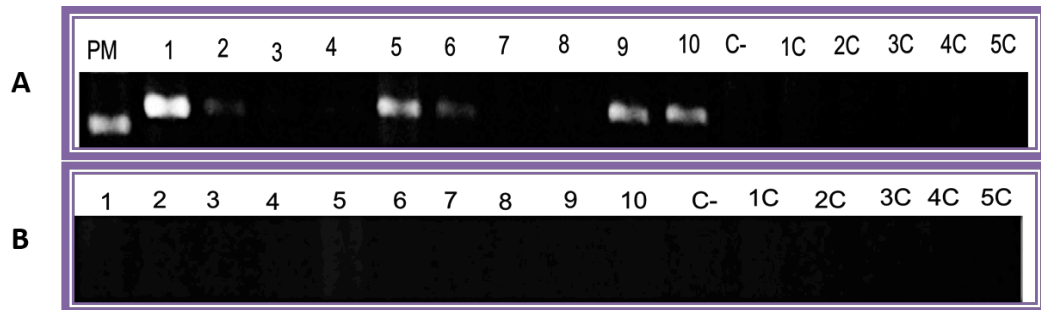


Figura 15. A) Electroforesis de los productos de amplificación para el gen Bclx-L en grupo tratamiento y en el grupo control. B) Electroforesis de la Reacción de la Cadena de la Polimerasa del gen Bclx-S en grupo tratamiento y en el grupo control. PM: Peso molecular, C-: Control negativo, 1-10: Grupo tratamiento, 1C-5C: Grupo Control.

Para obtener valores cuantificables que pudieran ser analizados posteriormente, los resultados obtenidos de la electroforesis fueron analizados con el software ImageJ y los resultados se observan en los siguientes gráficos y en tablas:

Muestra	Área	Porcentaje
1	24977.761	10.477
2	24367.64	10.221
3	21625.64	9.071
4	20889.64	8.762
5	30495.175	12.791
6	26888.882	11.279
7	14725.468	6.177
8	19257.054	8.077
9	28861.004	12.106
10	26318.761	11.039

Tabla 9. Valores obtenidos de la electroforesis de la PCR del gen Bax

Muestra	Área	Porcentaje
1	31060.711	22.169
2	16647.418	11.882
3	16055.418	11.459
4	3636.468	2.595
5	36023.761	25.711
6	8728.832	6.23
7	1543.255	1.101
8	1664.912	1.188
9	18341.518	13.091
10	6407.054	4.573

Tabla 10. Valores obtenidos de la electroforesis de la PCR del gen Bcl2

Muestra	Área	Porcentaje
1	33276.175	33.563
2	3741.711	3.774
3	1960.033	1.977
4	3127.004	3.154
5	21059.004	21.24
6	5804.589	5.855
7	2492.104	2.514
8	2810.225	2.834
9	13542.882	13.659
10	11332.589	11.43

Tabla 11. Valores obtenidos de la electroforesis de la PCR del gen Bclx-L

Los valores de las áreas de amplificación obtenidas de el análisis por densitometría en cada uno de los genes relacionados con los procesos apoptóticos fueron comparados con los valores obtenidos de la amplificación del gen de beta actina para lograr obtener un valor de relación fijo y objetivo utilizando al gen control y así poder determinar de manera consistente la verdadera alteración de cada uno de los genes involucrados. Se observó una mayor cantidad de área de amplificación en el 80% de los individuos para el gen proapoptótico Bax, en comparación con los genes antiapoptóticos, a su vez se pudo constatar que no existía una relación entre una mayor área de amplificación del gen ITS2 de *Toxocara canis* y la los individuos que mostraban bandas más intensas para el gen Bax. Los valores en porcentaje en relación al gen constitutivo de cada uno de los genes analizados se describen en la siguiente tabla:

	Toxocara	Bax	Bcl2	Bclx-L
1	119.64%	86.57%	107.65%	115.33%
2	113.41%	110.52%	75.50%	16.97%
3	95.28%	103.99%	77.20%	9.42%
4	184.88%	112.23%	19.53%	16.80%
5	139.32%	85.78%	101.33%	59.24%
6	132.02%	90.62%	29.42%	19.56%
7	210.39%	89.33%	9.36%	15.11%
8	101.88%	108.59%	9.38%	15.84%
9	83.86%	99.09%	62.97%	46.50%
10	162.02%	93.124%	22.67%	40.09%

Tabla 12. Análisis por densitometría de la amplificación de los genes ITS2, Bax, Bcl2 y Bclx-L en relación con los resultados del análisis del gen de beta actina

6.6 Determinación de apoptosis en tejido cerebral por medio de la técnica de TUNEL

Para determinar la presencia de células cerebrales que hayan muerto por apoptosis se realizó la técnica de TUNEL.

Después de modificar el protocolo recomendado por el fabricante para poder obtener controles positivos y negativos las muestras pudieron ser procesadas y biotiladas con peroxidasa de rábano y teñidas con diaminobenzidina, posteriormente se comenzó a analizar detenidamente la presencia de células de color pardo contrastantes con la tinción de fondo verde metileno, sin embargo a pesar de los indicadores moleculares proapoptóticos identificados en los ensayos de Reacción de Cadena de la Polimerasa, la presencia de células apoptóticas en el tejido fueron muy limitadas. Las células detectadas como positivas fueron algunas neuronas piramidales que conforman la

porción granulosa del cerebelo, así como células de la microglia que conforman parte de la corteza cerebral. Pudieron ser observadas larvas en el tejido procesado con la técnica de TUNEL sin embargo no se encontraron células apoptóticas alrededor o cerca de las mismas (Fig.16 y 17).

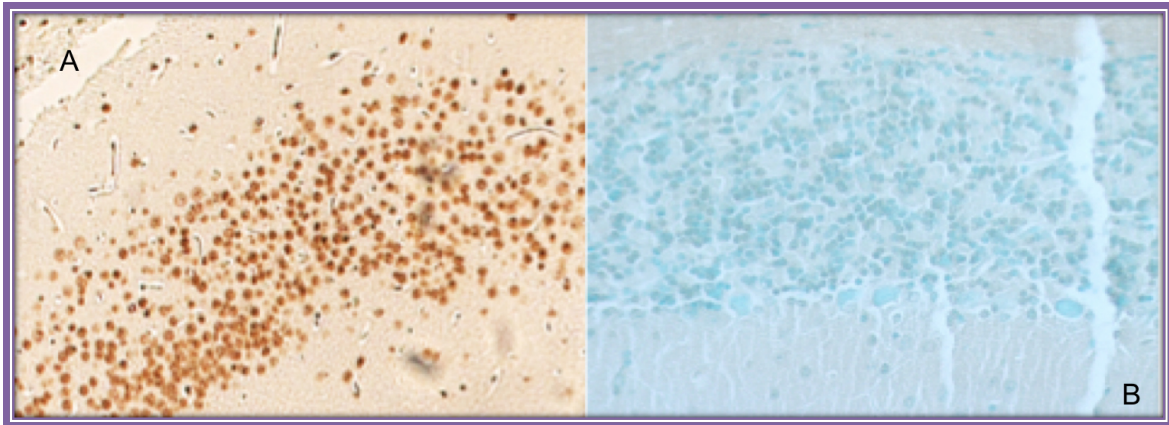


Figura 16. Técnica de TUNEL en tejido cerebral. A) Control positivo B) Control negativo

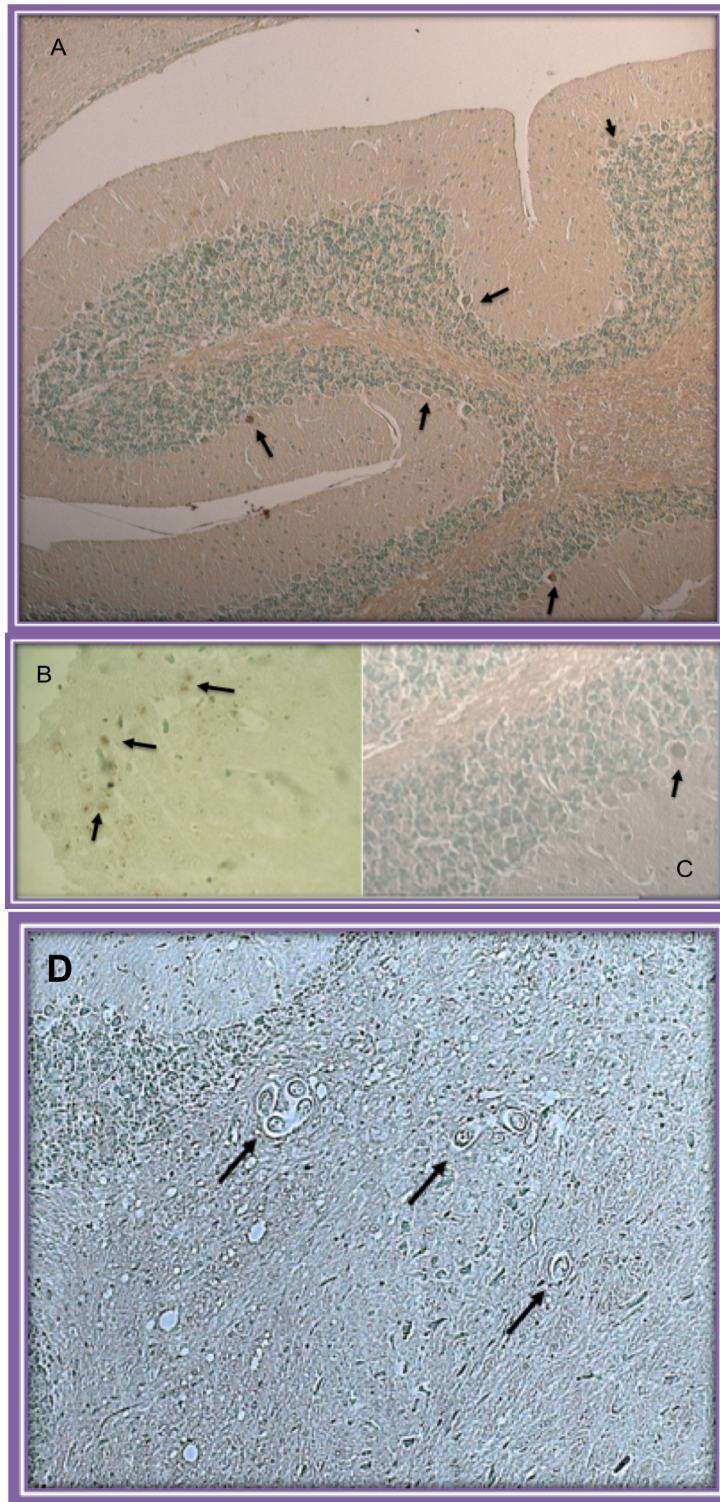


Figura 17. A) Células piramidales cerebelares positivas por la técnica de TUNEL B) Células gliales positivas cercanas a la corteza cerebral C) Células piramidales cerebelares positivas. D) Larvas en cerebro medio

6.7 Análisis de lesiones en cerebro en ratones infectados con huevos larvados de *Toxocara canis*.

Se analizaron cortes longitudinales de la mitad del encéfalo por histopatología, se realizaron tres cortes de cada caso y se sometieron a la tinción de PAS, H&E y Tinción de Masson.

Dentro de los principales hallazgos podemos mencionar la presencia de larvas en cerebro medio rodeando en su mayoría el hipocampo (figura 18-21) que no presentaban células reactivas a su alrededor, además de esto las principales lesiones identificadas fueron desmielinización generalizada (figura 22), edema perivascular generalizado (figura 23), leve infiltración perivascular en corteza cerebral (figura 24), focos difusos de microgliosis (figura 25), zonas focalizadas de hemorragias ubicadas principalmente en cerebro medio y zona de la corteza (figura 26), . Fue posible la visualización de neuronas con cromatina condensada y fragmentación nuclear principalmente en la zona de cerebro medio (figura 27).

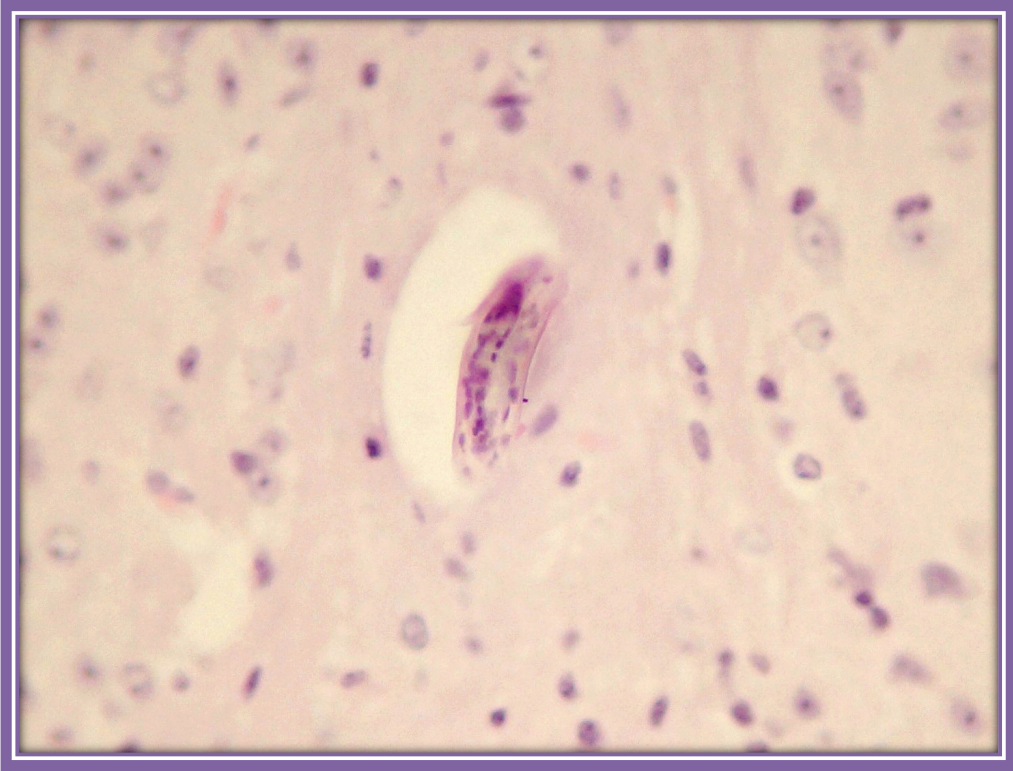


Figura 18. Larva en cerebro medio. 40X H&E

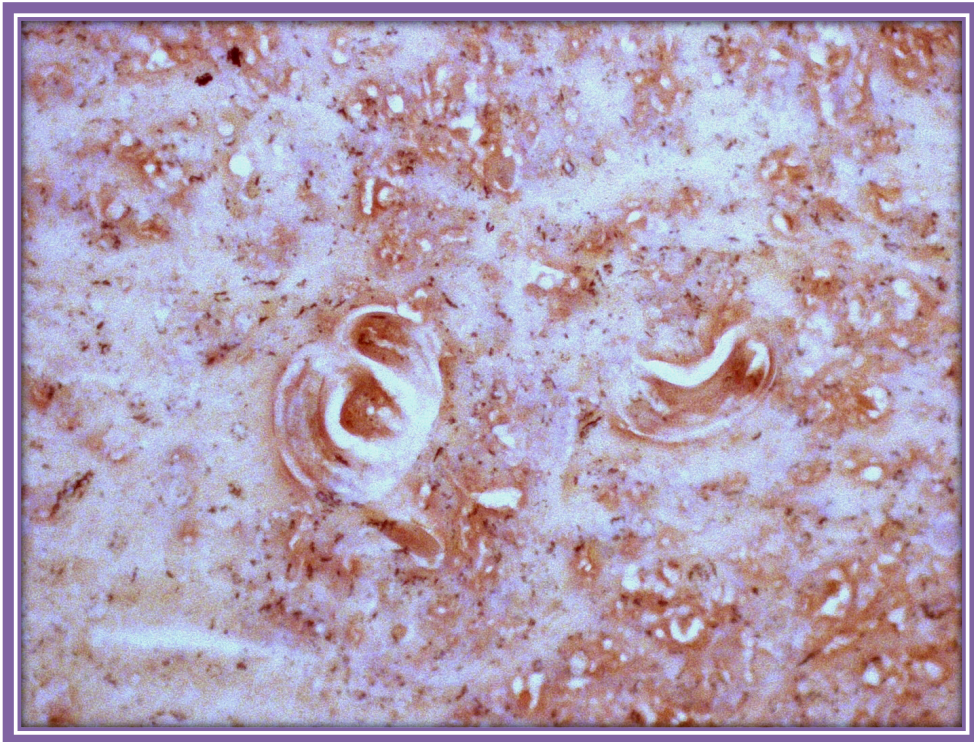


Figura 19. Larva en cerebro medio. 40X Tinción de Masson.

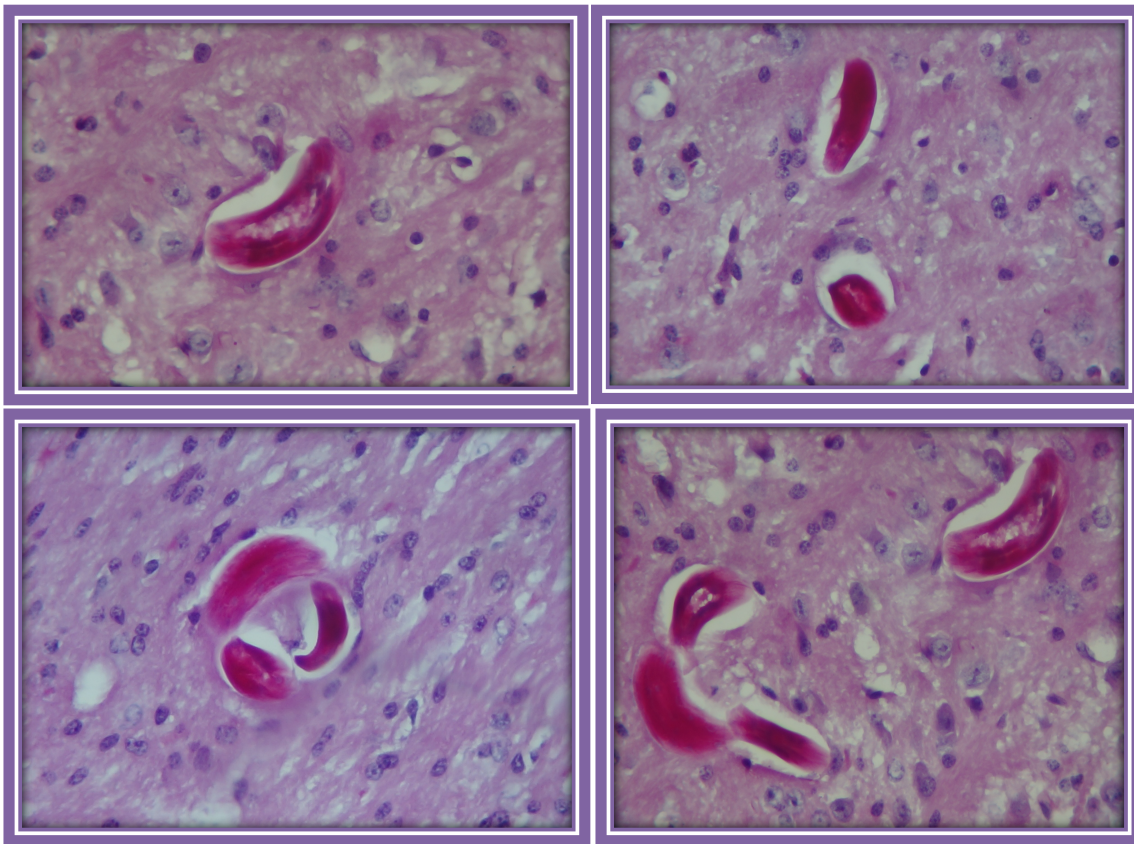


Figura 20. Larvas en cerebro medio. 100X PAS

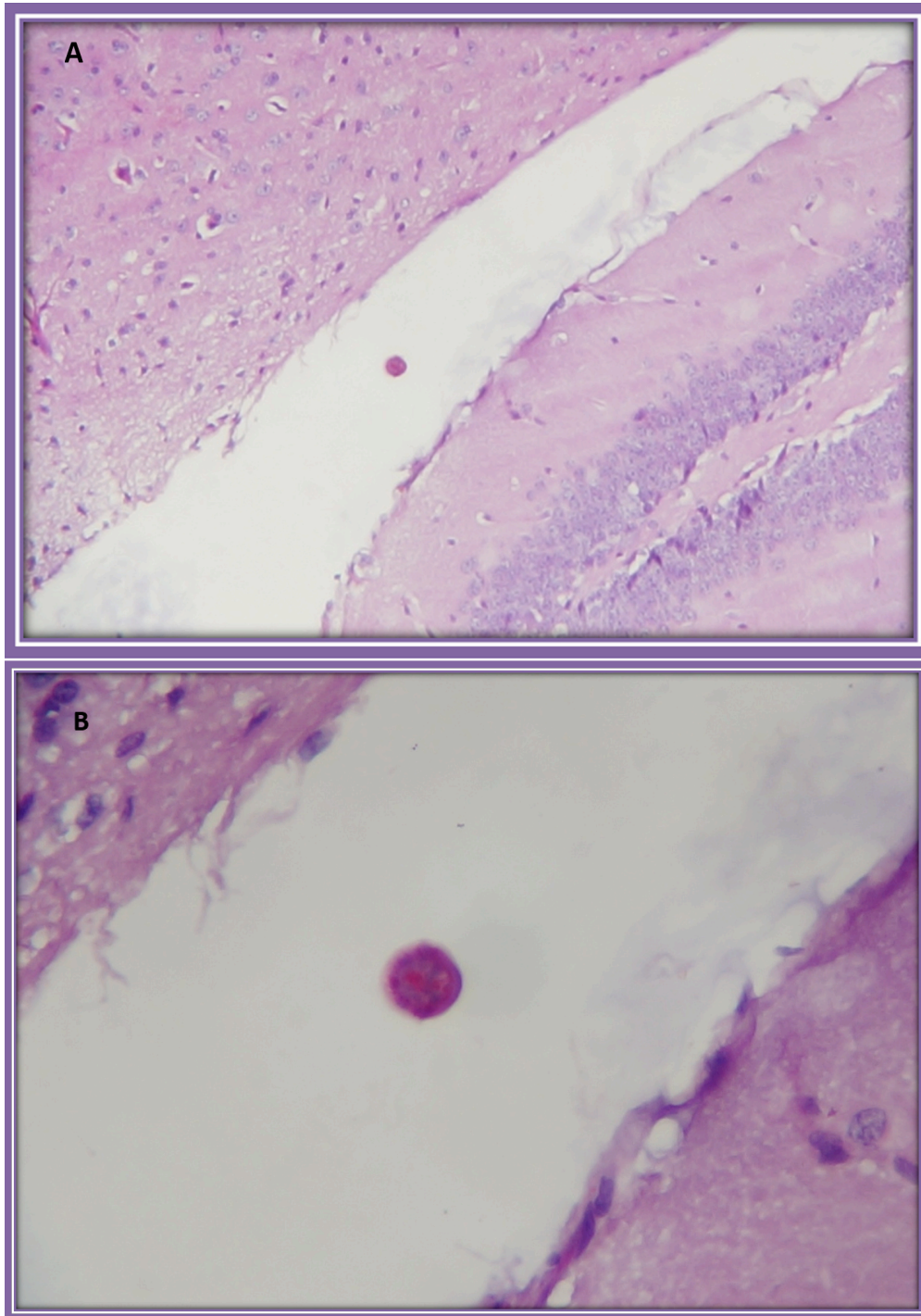


Figura 21. A) Larva en líquido cefalorraquídeo a nivel de hipotálamo. 40X H&E

B) Larva en líquido cefalorraquídeo a nivel de hipotálamo. 100X PAS

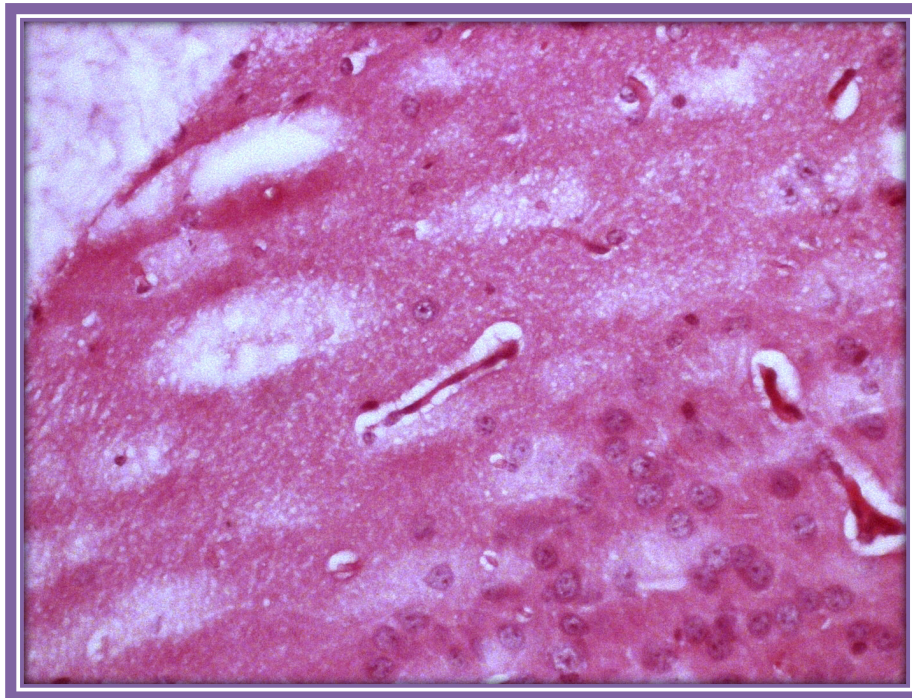


Figura 22. Zonas de desmielinización y edema perivascular. Corteza prefrontal. 40X PAS

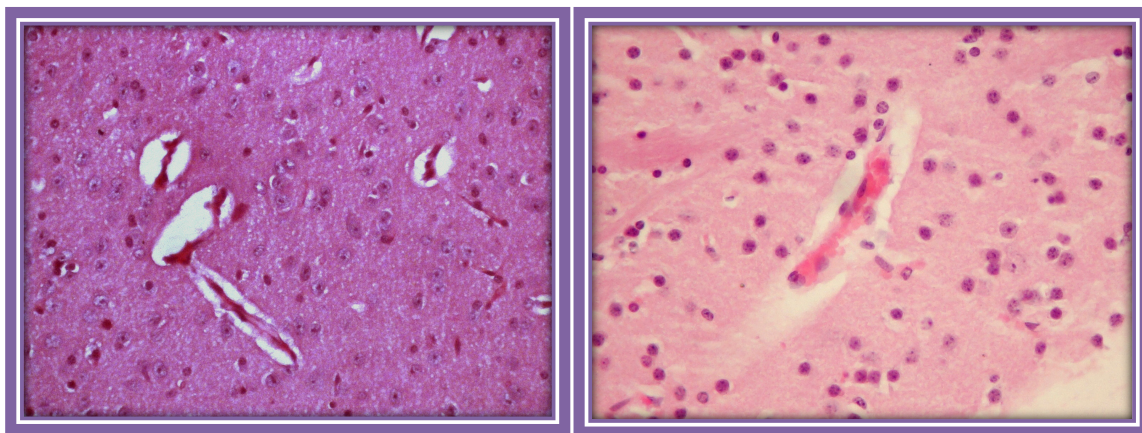


Figura 23. A) Edema perivascular. Cerebro medio. 40X PAS B) Edema perivascular. Cerebro medio. 40X H&E

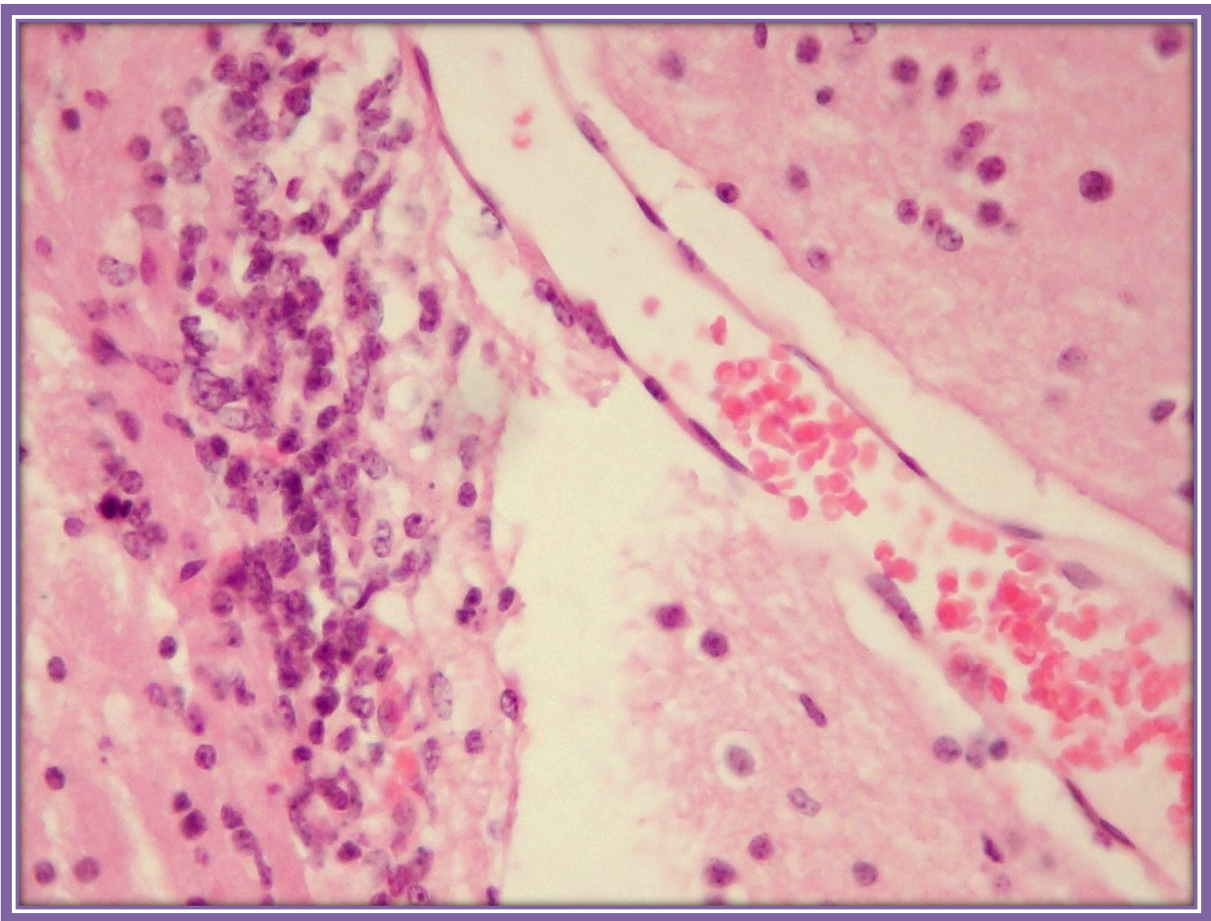


Figura 24. Edema perivascular e infiltración perivascular. Cerebro medio. 40X PAS

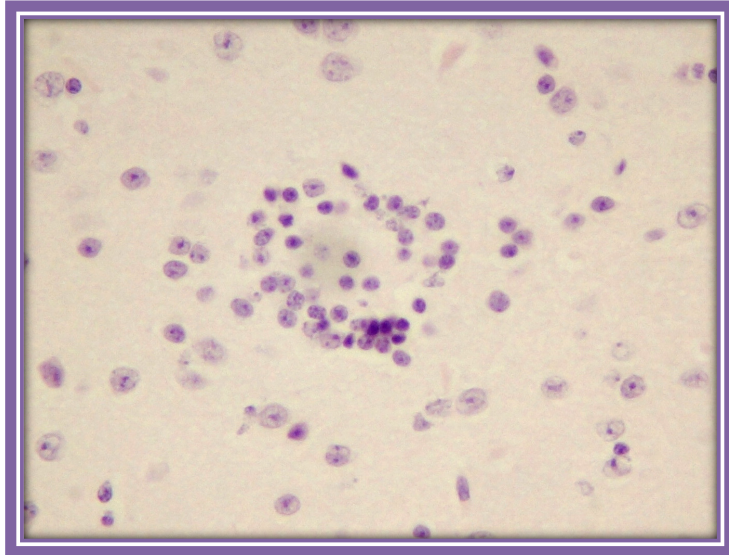


Figura 25. Microgliosis Cerebro medio. 40X H&E

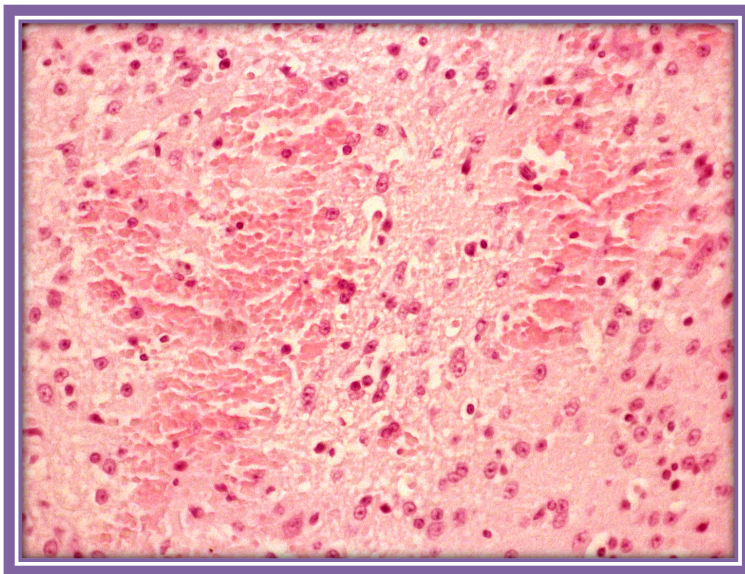


Figura 26. Hemorragia en cerebro medio. 40X H&E

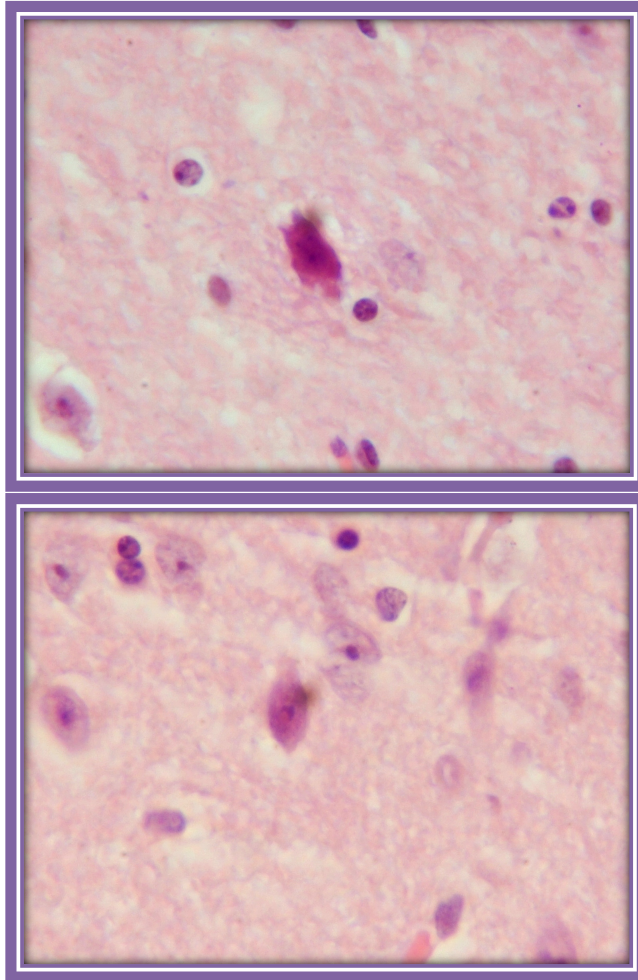


Figura 27. Condensación de cromatina y fragmentación nuclear en neurona en cerebro medio. 100X PAS

6.8 Observación del comportamiento en los diferentes grupos

A pesar de no realizar estudios metódicos conductuales, se pudo constatar de un cambio de comportamiento significativo. Durante los 21 días del tratamiento los animales tuvieron acceso a enriquecimiento ambiental en forma de túneles y sustrato moldeable los cuáles utilizaban constantemente, sin embargo a partir de la primera semana post-infección se pudo constatar de una disminución de actividad, aletargamiento, agrupamiento constante, disminución del estado de alerta y automutilaciones, en contraste con el grupo control que mantuvo un ritmo de actividad constante y un estado de alerta normal. Además de lo anterior los animales que conformaban el grupo tratamiento para el final del periodo eran más dóciles de manejar en contraste con el grupo control.



Figura 28. Cambios de comportamiento en grupo tratamiento Vs grupo control

7. DISCUSIÓN

Toxocara canis es un parásito zoonótico que se encuentra en el intestino delgado de caninos menores de 6 meses, sin embargo en animales mayores de seis meses al igual que en hospederos paraténicos el parásito no se desarrolla en su etapa adulta sino que realiza una migración somática como larva 3 dónde puede migrar y entrar en estado de hipobiosis en diferentes órganos como hígado, pulmones, ojo y cerebro. Una de las posibles causas por las que en caninos mayores de 6 meses, a pesar de ser la especie que utiliza el parásito como hospedador definitivo, no suele desarrollarse el adulto, es por la capacidad del parásito de infectar transplacentariamente, ya que larvas en estado de arresto se reactivan y migran hacia el útero infectando los cachorros y desarrollándose en ellos la etapa adulta, siendo este fenómeno un posible evento que aumente la posibilidad de supervivencia y desarrollo del parásito pues aumenta la posibilidad de infección de hospederos definitivos sin inmunidad previa específica (De la Fé Rodríguez, D., Duménigo Ripoll, D., Brito Alberto, D., *et al.* 2006).

Durante la fase de muestreo en los diferentes centros antirrábicos del área metropolitana de Nuevo León, pudimos percatarnos de la alta incidencia de *T. canis* en el intestino de cachorros, sin embargo hasta el momento no se han reportado datos objetivos que reflejen la verdadera prevalencia de este parásito en los cánidos del norte de México. Existen diferentes estudios que han tratado de retratar la realidad epidemiológica de este parásito en México, algunos autores citan desde 13% hasta un 76% de prevalencia, sin embargo estos datos podrían ser poco objetivos y podrían no plasmar del todo la realidad de la verdadera prevalencia del parásito ya que a pesar de ser una enfermedad zoonótica, la toxocariosis no es una enfermedad de reporte obligatorio, por lo que la prevalencia de este parásito podría ser mayor a la reportada en estos estudios. Otro punto importante es que estos estudios fueron realizados en el sur de México, y considerando las diferencias ambientales que prevalecen en el norte del estado aunado a la dependencia del parásito por las condiciones ambientales es necesario la realización de estudios en el norte del país que determinen la realidad

epidemiológica de *T. canis* y el verdadero riesgo de exposición y transmisión. (Germinal J., Campos F. 2002. & Martínez I., Fernández A., Vázquez O., Ruiz, A. 1998)

La embriogénesis de los huevos obtenidos de los nemátodos adultos recolectados del intestino de cachorros se realizó utilizando las condiciones de tiempo y temperatura que la literatura recomienda, sin embargo los tiempos necesarios para obtener la etapa de larva 2 infectante fue sumamente variable en relación a lo reportado en la literatura y se pudo identificar una diferencia notable entre cada uno de los lotes colectados en cada municipio, considerando las condiciones de incubación constantes en cada uno de los lotes, éste resultado sugiere la posibilidad de diferentes cepas del parásito en las diferentes zonas del área metropolitana que pudieran tener una variación en la patogenicidad o capacidad de adaptación y que pudiera deberse a la exposición a diferentes factores como diferencias climáticas, exposición a hospederos paraténicos o definitivos, desparasitaciones frecuentes y desarrollo de resistencias (Oaks J., Kayes S., 1980).

Otro aspecto importante a considerar en la incubación de los huevos fue el medio utilizado para lograr ser embrionados, la literatura ha reportado el uso de solución salina y la incubación en cajas de Petri como un medio adecuado para lograr obtener la etapa infectante del parásito, sin embargo la contaminación de los lotes utilizando estas recomendaciones era sumamente frecuente, por lo que utilizamos diferentes medios propuestos por la literatura como la administración de estreptomycinina al medio de solución salina, así como utilizar el medio de cultivo RPMI e hidróxido de sodio al .1% siendo el último con el que se obtuvieron mejores resultados disminuyendo en porcentaje de contaminación hasta en un 80%, por lo que consideramos que el uso de hidróxido de sodio al .1% como medio de cultivo representa una medida útil para evitar la contaminación de lotes de huevos de *Toxocara canis* que se encuentren en incubación para obtener la etapa infectante (R. Maizels, D. D. Savigny. B. Ogilvie. 2007 & Wisam M. Al-Saeed, Hind J. Mahmoo. 2011).

La migración de *Toxocara canis* en hospederos paraténicos ha sido motivo de numerosos ensayos con el objetivo principal de analizar el verdadero efecto de la larva migratoria en los órganos afectados por la misma, y en el proceso se han utilizado numerosos modelos experimentales que incluyen roedores y otros mamíferos de mayor tamaño como cerdos obteniendo diferentes tipos de resultados. Se ha comprobado en la mayoría de los modelos un tropismo por sistema nervioso en la mayoría de los hospederos paraténicos, sin embargo se ha visto un tropismo mayor en los modelos murinos, lo que aunado a la similitud de la ruta migratoria del parásito del ratón con el humano lo vuelve un modelo de neurotoxocariosis ideal. Existen estudios que han relacionado las dosis utilizadas y los días transcurridos post-infección con el órgano afectado, por lo que se vuelve imperativo establecer las características específicas de dosis y condiciones generales que pudieran estandarizar lo necesario para establecer un modelo adecuado de neurotoxocariosis. Este estudio provee condiciones de dosis y manejo específicas para lograr una migración efectiva a cerebro en ratones (Strube C., Heuer L., Janecek E. 2013).

En diferentes estudios se utilizan diferentes dosis de inoculación y se encontró una relación entre el número de huevos inoculados y el órgano afectado. En este estudio se utilizó una dosis alta de 2500+-50 huevos para asegurar una migración efectiva a cerebro y se comprobó la misma por diferentes medios en la totalidad de los ratones inoculados coincidiendo con la literatura revisada que también reporta el enorme tropismo por cerebro en modelos murinos, sin embargo es importante estudiar la dosis mínima necesaria para lograr una migración efectiva a cerebro que pudiera determinar, considerando la frecuente exposición del parásito con humanos, el verdadero riesgo de el desarrollo de neurotoxocariosis (Havasiova-Reiterova K, Tomasovicova O, Dubinsky P. 1995).

Se ha reportado relación entre el periodo de incubación en el ratón con la magnitud del daño en el órgano, encontrándose focos hemorrágicos en cerebro a nivel macroscópicos desde el día 7 post infección, lo que coincide con la identificación de larvas en cerebro al día 6 post-infección en este estudio, sin

embargo a nivel macroscópico no se encontraron lesiones en absoluto durante todo el experimento, incluso en los ratones analizados en la etapa final de 21 días post-infección. Una de las posibles causas sería la diferencia de edad de los ratones, ya que este estudio utilizó ratones adultos mientras que el modelo experimental del estudio antes mencionado utilizó ratones jóvenes, que pudieran tener un sistema inmune más inmaduro, lo que favorece la supervivencia y migración de la larva en el hospedero. Por lo que establecer la edad del ratón al momento de la inoculación parece ser una pieza clave en la estandarización de un modelo murino de neurotoxocariosis. Algunos estudios mencionan que por encima del día 42 post infección el número de larvas en cerebro aumentó considerablemente, sin embargo en este estudio se comprobó que para el día 21 post infección ya se presentaba una cantidad considerable de larvas por campo aunque el conteo y recuperación larvaria pudiera optimizarse utilizando técnicas de digestión artificial y conteo larvario (Janecek E., Beineke A, Schnieder T., Strube C. 2014).

Una vez analizados los cerebros de los ratones infectados por medio de compresión tisular para la identificación de las larvas morfológicamente compatibles con *T. canis*, la parte congelada fue analizada por PCR para la expresión del gen ITS2 de *Toxocara canis* para el diagnóstico molecular de neurotoxocariosis en los ratones tratamiento, para esto se realizó el método de extracción por columnas, sin embargo la porción del cerebro destinada a este procedimiento era solo la mitad del encéfalo de los ratones tratamiento por lo que la cantidad de ARN obtenida fue sumamente limitada por lo que se requerían grandes volúmenes para poder obtener suficiente ADNc para el posterior análisis de la expresión de genes apoptóticos, por lo que a pesar de obtener RNA de excelente calidad se sugiere equilibrar las ventajas y desventajas de este método de extracción y en caso de necesitar grandes cantidades de ADNc utilizar otros métodos de extracción como el método por Trizol. Para analizar la integridad del ADNc se analizó la expresión del gen constitutivo beta actina de humano, que anteriormente ha sido utilizado en modelos murinos comprobándose su homología, sin embargo el protocolo reportado en la literatura tuvo que ser

modificado disminuyendo la temperatura de alineamiento de 63^aC a 53^aC, una de las posibles causas de esta situación puede ser la diferencia de marcas en los termocicladores utilizados en los diferentes laboratorios, por lo que estandarizamos el protocolo en nuestro laboratorio para optimizar los resultados.

Existe muy pocos estudios en la literatura sobre la relación de la migración cerebral de *Toxocara canis* y la apoptosis en cerebro, siendo solo 2 estudios encontrados. Al analizar los resultados de la expresión de genes apoptóticos por PCR observamos expresión del gen proapoptótico Bax reflejados en la electroforesis por una banda intensa en la totalidad de los ratones infectados contrario a la expresión del grupo control en los que la expresión era nula o muy poca, esto contradice lo reportado por Zheng S. y colaboradores en el 2006 donde reportaron en un ensayo de infección experimental similar al presente que no había alteración alguna del gen Bax en los ratones positivos a neurotoxocariosis al día 25 de la infección. Adicionalmente se analizó la expresión de Bcl-2 en los ratones infectados y se obtuvo una expresión en el 80% de los ratones infectadas con bandas resultantes de intensidad leve a alta, este resultado contrasta de la misma forma con los reportado por Zheng S. y colaboradores en los que no pudieron identificar ninguna alteración del gen Bcl-2 en su grupo tratamiento. Para el análisis de los genes Bclx-L y Bclx-S no se encontró literatura que pudiera plantar un antecedente de su estudio en la neurotoxocariosis; en el presente estudio se pudo identificar una alteración del gen Bclx-L en el 60% de los ratones tratamiento con bandas de intensidad que variaban de leve a moderada, los resultados para el gen Bclx-S muestran que no existen alteración ni diferencia en la expresión de este gen en el grupo tratamiento en comparación con el grupo control. La evidente expresión del gen proapoptótico Bax reforzado por los estudios de análisis de imagen que indican un porcentaje mayor de área de banda de Bax en la mayoría los animales que el resto de los genes es un fuerte indicativo de la alteración de los procesos de muerte celular programada, sin embargo la expresión a la par de genes anti-apoptóticos puede sugerir que el proceso de apoptosis está iniciando, y que aunado a los estudios que relacionan el periodo de infección con la patogenia de la enfermedad es posible que el análisis fuera

realizado en una etapa temprana por lo que la valoración de los mismos genes en etapas tardías podría ser de utilidad para determinar el verdadero efecto de la larva migratoria en la alteración de estos genes, dentro de esta misma línea un análisis que determine la actividad de las caspasas ejecutoras podría ayudar a determinar si es que el proceso de apoptosis llego a su término en esta etapa de la infección (Zheng S., Li, J. Shen Ji., Wang X. 2006 & Hsiao W. Et al. 2013).

Los estudios de análisis de imagen de los genes apoptóticos confirman una expresión superior de Bax por sobre los demás genes en el 80% de los animales tratamiento al detectar una banda mayor que la observada en los demás genes. El gel producto de la electroforesis realizada para analizar la expresión del gen ITS2 de *T. canis* fueron analizados por este mismo software para intentar establecer alguna relación entre una mayor expresión del gen ITS2 con una mayor expresión de genes proapoptóticos, sin embargo no se pudo encontrar una relación consistente y respectiva con la expresión del gen de ITS2 y los genes apoptóticos estudiados, sin embargo si se encontró una relación directamente proporcional entre la mayor área de banda detectada para el gen de *T. canis* y el número de larvas por campo encontradas en la técnica de compresión tisular, esto pudiera ser la pauta inicial para establecer una relación de la carga parasitaria entre los diferentes métodos de diagnóstico.

Para reforzar el análisis de la alteración de procesos apoptóticos reflejados en los estudios por PCR se utilizó la técnica de TUNEL para detección de apoptosis en el tejido, poder optimizar los resultados modificamos el protocolo sugerido por el fabricante utilizando en lugar de proteinasa K por 1 hora, cytonina por 15 horas en cámara húmeda y a 37°C, para aumentar la permeabilización del tejido y poder obtener un control positivo, es posible que la naturaleza del tejido nervioso aunado al proceso de fijación limiten la permeabilización del tejido por lo que modificaciones como la implementada en este estudio pueden ser necesarias para lograr optimizar la técnica aplicándola en tejido nervioso.

Los resultados obtenidos por la técnica de TUNEL mostraron pocas neuronas piramidales de la capa granular del cerebelo teñidas de color pardo

indicando apoptosis, esto podría coincidir con la literatura que menciona un mayor número de lesiones a nivel de cerebelo en animales con neurotoxocariosis. Al analizar las células alrededor de las larvas detectadas en cerebro, pudimos observar que no muestran ninguna alteración detectable por la técnica de TUNEL, la poca presencia de células en apoptosis en este ensayo pudiera reforzar la teoría de un proceso de apoptosis incipiente que debe ser estudiado y validado en días posteriores a los 21 días de la infección.

Para el análisis de lesiones debido a la larva somática de *T. canis* por histopatología se utilizaron 3 tinciones para lograr optimizar los resultados, las tinciones utilizadas fueron H&E, PAS, y Tinción de Masson; se pudo constatar que la mejor tinción para visualizar las larvas es la tinción de PAS, sin embargo para la identificación y el análisis de las lesiones reportadas la tinción de H&E obtuvo mejores resultados. Se sugiere en este tipo de estudios realizar dos cortes y las dos tinciones a la par, para poder visualizar las larvas y analizar las lesiones de manera objetiva.

Las lesiones identificadas mediante histopatología coinciden con lo reportado en la literatura (hemorragias, microgliosis, linfocitos perivasculares, desmielinización y presencia de células gitter), sin embargo la literatura reporta extensas zonas de hemorragias en contraste con nuestros resultados donde las hemorragias eran pequeñas y se encontraban aisladas. Un hallazgo interesante del presente estudio es la elevada incidencia de larvas somáticas en el hipocampo que hasta el momento no ha sido reportado en ningún estudio y que puede coincidir con revisiones que mencionan tropismo por la masa cerebral pero contrasta con los estudios que señalan el cerebelo como principal sección afectada en el sistema nervioso central, en nuestro estudio no se pudieron identificar larvas en cerebelo (Burren, C.H., 1972 & Burren CH. 1971 & Janecek E., Beineke A, Schnieder T., Strube C. 2014 & Strube C., Heuer L., Janecek E. 2013).

Otra observación relevante del estudio es que a pesar del gran tamaño y de la elevada motilidad que presentan las larvas de *T. canis*, incluso casi una hora

después de la extracción del encéfalo, la presencia de sistema inmune reactivo era prácticamente nulo y en ninguno de los casos se encontraban cerca de las larvas, esto coincide con diversos estudios que sugieren la capacidad de *T. canis* de excretar antígenos de secreción/excreción que logre modular la respuesta inflamatoria, y la ausencia de células inflamatorias alrededor de la larva refuerza estas observaciones, sin embargo existen estudios que reportan la presencia de granulomas eosinofílicos como hallazgo típico de la patogenia de el síndrome de larva migrans visceral en hígado y pulmones, así que esto nos puede sugerir que la ausencia de respuesta inflamatoria se debe a la naturaleza inmunológicamente privilegiada del sistema nervioso central o a la posibilidad de que los antígenos antes mencionados solo se excreten en ciertos órganos, la identificación de la variedad de antígenos en diferentes órganos requiere más estudios. (Maizels R. 2013 & J.D. Dunsmore, R.C.A. Thompson, I.A. Bates. 1983 & Fioretti D, P.*et al.* 1989).

Además de estas observaciones si analizamos los resultados obtenidos por medio de la técnica de TUNEL junto con los estudios que señalan mayor afección en el cerebelo podemos suponer que durante la migración de la larva estos antígenos de secreción/excreción modulan la respuesta inflamatoria alrededor de la larva para protegerla de ser destruida por el sistema inmune al igual que inhibir la apoptosis en un momento temprano para evitar la agregación de células del sistema inmune que se encarguen de fagocitar estas células en apoptosis y al mismo tiempo poner en riesgo la supervivencia de la larva, sin embargo existe la posibilidad que el daño que observamos y que se reporta en otros estudios se deba a la estela de migración que en ausencia de la larva y sus antígenos de secreción/excreción puede reaccionar de manera normal a un agente extraño o daño mecánico, esto podría sugerirnos el tronco del encéfalo como una vía de entrada del parásito y de infección temprana.

Como se mencionó anteriormente el tropismo por sistema nervioso central en una parasitosis por *T. canis* ha sido comprobado en este y otros estudios, una de las teorías que intentan dar una explicación a esta preferencia migratoria en los

hospedadores paraténicos es el posible desarrollo de un mecanismo de supervivencia por parte del parásito, en dónde el objetivo principal de migrar al sistema nervioso central sería alterar la conducta del hospedador paraténico, volviéndolo lento y temerario, con el objetivo de volver una presa fácil para el hospedador definitivo y así completar su desarrollo biológico, sin embargo esto no está comprobado aún (Hollad C., Hamilton C. 2013 & Holland CV, Cox DM 2001 & Chieffi PP, Aquino RT, Pasqualotti MA, *et al.* 2010).

El compromiso del hipocampo y cerebelo podría tener una relación y apoyar las hipótesis comportamentales que indican que *Toxocara canis* vuelve al ratón temerario y lento o que lo hace una presa fácil para su depredador, ya que el cerebelo es el encargado de controlar la función motora. El posible que el compromiso del hipocampo refuerce las teorías de la relación de neurotoxocariosis con el déficit de atención e hiperactividad, así como el bajo rendimiento escolar en niños ya que dentro de las funciones del hipocampo se relaciona la memoria a corto y largo plazo, así como su afección con cuadros de hiperactividad reportado en roedores como modelos experimentales (Jarrard L. 1993, & K. Plessen, R. Bansal, H. Zhu. 2006 &

En el presente estudio se comenzaron a ver cambios conductuales al día 12 post infección, los cambios observados eran principalmente letargo y ataxia, sin embargo estudios conductuales profundos y específicos son necesarios para confirmar el compromiso conductual del hospedero resultante de la infección por *Toxocara canis*; no obstante estos resultados apoyan las observaciones obtenidas por otros estudios donde reportan alteraciones en el comportamiento de animales infectados por *T. canis*.

8. CONCLUSIONES

- El medio que optimiza el proceso de embriogénesis y asegura una menor contaminación de los lotes de *Toxocara canis* es el hidróxido de sodio al .1%.
- Una dosis oral de 2500+-50 huevos embrionados asegura una migración de *Toxocara canis* a cerebro en ratones adultos, lo que podría utilizarse como indicaciones para establecer un modelo de neurotoxocariosis.
- El ratón representa un excelente modelo experimental de neurotoxocariosis al tener un elevado tropismo por sistema nervioso central y al sufrir una ruta de migración similar al humano.
- Con una dosis infectiva de 2500+-50 huevos por vía oral es posible visualizar larvas en cerebro al día 6 post-infección.
- Debido al limitado tamaño de muestra que representa el cerebro del ratón debe considerarse la utilización de técnicas que optimicen la cantidad de extracción de ARN como el método por Trizol.
- La migración a cerebro de *Toxocara canis* altera la expresión de los genes Bax, Bcl-2 y Bcl-xl, relacionados con la apoptosis.
- Existe un aumento significativo en la expresión de Bax en ratones infectados con *Toxocara canis* al día 21 de la infección.
- No existió correlación en el análisis de imagen de las bandas obtenidas por electroforesis de la expresión del gen ITS2 y la expresión de genes relacionados con la apoptosis.
- Existe una correlación positiva con el área de banda producto del análisis de imagen de geles de la electroforesis para el gen ITS2 y el número de larvas por campo observado por medio del método de compresión tisular.
- Son necesarios más estudios que analicen por cerebros infectados por periodos más extensos la expresión de genes relacionados con apoptosis, así como analizar la actividad de las caspasas para comprobar una fase ejecutora en las células comprometidas.

- La apoptosis identificada por medio de la técnica de TUNEL al día 21 post-infección fue muy limitada y comprometía las neuronas piramidales de la capa granular del cerebelo.
- Existe nula respuesta inflamatoria alrededor de las larvas encontradas en el cerebro de ratones infectados con *T. canis*.
- El mayor número de larvas somáticas de *T. canis* identificadas por medio de histopatología se encontraban alrededor del hipocampo.
- Las principales lesiones identificadas al día 21 post-infección con huevos embrionados por *Toxocara canis* por histopatología son la presencia de hemorragias, desmielinización, focos de microgliosis y edema perivascular.
- La mejor tinción para visualizar larvas migratorias de *Toxocara canis* en el cerebro es PAS y para analizar las lesiones ocasionadas por las larvas es la H&E.
- Se presentaron alteraciones conductuales significativas a partir del día 12 de infección, son necesarios más estudios para entender el efecto sobre la conducta de una infección cerebral por *T. canis*.

Son necesarios más estudios multidisciplinarios que analicen el verdadero efecto de la larva somática de *Toxocara canis* en el cerebro de los hospedadores paraténicos.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Sariego I, Kanobana K, Núñez F. (2012) Toxocariasis in Cuba: A Literature Review. PloS.
2. Del Valle G., Radman N., Burgos L., Archeli S. (2002) *Toxocara canis*: migración larval y eosinofilia en el hospedador paraténico. *Parasitología latinoamericana*. 57: 46-49.
3. Elsmore D., Flynn L (2015). Roundworm coproantigen detection. Solicitud de Patente. No de publicación: EP2886555 A1. No. De solicitud: EP20150154826.
4. De la Fé Rodríguez, D., Duménigo Ripoll, D., Brito Alberto, D., & Aguiar Sotelo, D. (2006). *Toxocara canis* y Síndrome Larva Migrans Visceralis (*Toxocara canis* and Syndrome Larva Migrans Visceralis). *Revista Electrónica De Veterinaria REDVET*, 7(4). Retrieved September 18, 2015, from <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>
5. Nieves, A., Ortega, B., Martínez, M., Castejón, O., Lares, M., & Ferrer, E. (2012). Estandarización de la técnica de ELISA para el diagnóstico inmunológico de toxocariasis humana. *BOLETÍN DE MALARIOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL*, 52(1), 21-33. Retrieved March 16, 2015
6. Brunaska, M., P. Dubinsky, K. Teiterova. 1995. *Toxocara canis*: Ultrasturctual Aspects of Larval Moulting in teh Maturing Eggs. *International Journal of Parasitology*, 25(5): 683-690.
7. Holland, C., & Smith, H. (2006). 14. In *Toxocara: The Enigmatic Parasite* (1st ed., Vol. 1, p. 313). CABI.
8. Johnstone, Colin D. (2000). *Parasites and Parasitic Diseases of Domestic Animals.* University of Pennsylvania, 24.
9. Beaver PC, Jung RC, Cupp EW. 1984. *Clinical parasitology*. 9th ed. Philadelphia: Lea & Febiger;. Genus *Toxocara*; p. 320- 322.

10. Despommier, D. (2003). Toxocariasis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology, and Molecular Aspects. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 16(2), 265–272.
11. Glickman, L.T., and P.M Schantz. (1981): "Epidemiology and Pathogenesis of Zoonotic Toxocariasis." *Epidemiologic Reviews* 3 230-50.
12. Minvielle MC, Niefeld G, Ciarmela ML, Basualdo JA. Toxocariosis causada por *Toxocara canis*: Aspectos clinicoepidemiológicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1999; 17: 300-6.
13. Nestor J, Pasamonte L, Marinconz R, De Marzi M, Cajal S, Malchiodi E. Parasitosis zoonóticas transmitidas por perros en el Chaco Salteño. *Medicina-Buenos Aires* 2000; 60:217-20.
14. Aldawek AM, Levkut M, Revajova V, Kolodzieyski L, Seveikova Z, Dubinsky P. Larval toxocarosis in sheep: the immunohistochemical characterization of lesions in some affected organs. *Vet Parasitol.* 2002; 105:207-14.
15. Barriga, O.O., 1988. A critical look at the importance, prevalence and control of toxocariasis and the possibilities of immunological control. *Vet. Parasitol.* 29, 195–234.
16. Brunaská, M., Dubinsky, P., Reiterová, K., 1995. Toxocaracanis: ultrastructural aspects of larval moulting in the maturing eggs. *Int. J. Parasitol.* 25, 683–690.
17. Webster, G.A., 1958b. A report on *Toxocara canis* Werner, 1782. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 22, 272–279.
18. Abo-Shehada, M.N., Herbert, I.V., 1984a. The migration of larval *Toxocara canis* in mice II. Post-intestinal migration in primary infections. *Vet. Parasitol.* 17, 75–83.
19. Magnaval, J.F., Glickman, L.T., Dorchies, P., Morassin, B., 2001. Highlights of human toxocariasis. *Korean J. Parasitol.* 39, 1–11
20. Akao, N., 2006. Critical assessment of existing and novel model systems of toxocariasis. In: Holland, C.V., Smith, H.V. (Eds.), *Toxocara: The Enigmatic Parasite*. CAB International, Oxfordshire, pp. 74–85.

21. Cox, D.M., Holland, C.V., 1998. The relationship between numbers of larvae recovered from the brain of *Toxocara canis*-infected mice and social behaviour and anxiety in the host. *Parasitology* 116, 579–594.
22. Sprent, J.F., 1958. Observations on the development of *Toxocara canis* (Werner, 1782) in the dog. *Parasitology* 48, 184–209.
23. Havasiová-Reiterová, K., Tomasovicová, O., Dubinsky, P., 1995. Effect of various doses of infective *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs on the humoral response and distribution of larvae in mice. *Parasitol. Res.* 81, 13–17.
24. Camparoto, M.L., Fulan, B., Colli, C.M., Paludo, M.L., Falavigna-Guilherme, A.L., Fernandez, M.A., 2008. Initial stage of development and migratory behavior of *Toxocara canis* larvae in BALB/c mouse experimental model. *Genet. Mol. Res.* 7, 444–450.
25. Ollero, M.D., Fenoy, S., Cuéllar, C., Guillén, J.L., Del Aguila, C., 2008. Experimental toxocariasis in BALB/c mice: effect of the inoculation dose on brain and eye involvement. *Acta Trop.* 105, 124–130.
26. Hamilton, C.M., Stafford, P., Pinelli, E., Holland, C.V., 2006. A murine model for cerebral toxocariasis: characterization of host susceptibility and behaviour. *Parasitology* 132, 791–801.
27. Zibaei, M., Sadjjadi, S.M., Uga, S., 2010. Experimental *Toxocara cati* infection in gerbils and rats. *Korean J. Parasitol.* 48, 331–333.
28. Akao, N., Tomoda, M., Hayashi, E., Suzuki, R., Shimizu-Suganuma, M., Shichinohe, K., Fujita, K., 2003b. Cerebellar ataxia due to *Toxocara* infection in Mongolian gerbils *Meriones unguiculatus*. *Vet. Parasitol.* 113, 229–237.
29. Sommerfelt, I.E., Rosa, A., Duchene, A., Degregorio, O., López, C., Pisanù, A., De Torres, R., 2004. *Toxocara canis* in experimentally infected pigs: migratory pattern and tissue lesions. *Vet. Parasitol.* 125, 323–334.
30. Taira, K., Permin, A., Kapel, C.M., 2003a. Establishment and migration pattern of *Toxocara canis* larvae in chickens. *Parasitol. Res.* 90, 521–523.

31. Watzke, R.C., Oaks, J.A., Folk, J.C., 1984. *Toxocara canis* infection of the eye correlation of clinical observations with developing pathology in the primate model. *Arch. Ophthalmol.* 102, 282–291
32. Beaver, P.C., 1969. The nature of visceral larva migrans. *J. Parasitol.* 55, 3–12.
33. Glickman, L.T., Summers, B.A., 1983. Experimental *Toxocara canis* infection in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *Am. J. Vet. Res.* 44, 2347–2354.
34. Oteifa, N.M., Moustafa, M.A., el-Gozy, B.R., Oteifa, N.M., 1996. Experimental congenital toxocariasis: effect on foetal future immune response. *J. Egypt Soc. Parasitol.* 26, 629–638.
35. Reiterová, K., Tomasovicová, O., Dubinsky, P., 2003. Influence of maternal infection on offspring immune response in murine larval toxocariasis. *Parasite Immunol.* 25, 361–368.
36. Reiterová, K., Tomasovicová, O., Dubinsky, P., 2006. Influence of *Toxocara canis* infection during pregnancy on offspring resistance towards re-infection. *Parasitology* 132, 625–633.
37. Jin, Z., Akao, N., Ohta, N., 2008. Prolactin evokes lactational transmission of larvae in mice infected with *Toxocara canis*. *Parasitol. Int.* 57, 495–498.
38. Magnaval, J.F., Glickman, L.T., Dorchies, P., Morassin, B., 2001. Highlights of human toxocariasis. *Korean J. Parasitol.* 39, 1–11.
39. De la Fé Rodríguez, D., Duménigo Ripoll, B., Brito Alberto, E., & Aguiar Sotelo, J. (2006). *Toxocara canis* y Síndrome Larva Migrans Visceralis (*Toxocara canis* and Syndrome Larva Migrans Visceralis). *Revista Electrónica De Veterinaria REDVET ISSN 1695-7504*, 2(4).
40. Fioretti D, P. et al. (1989). Eosinophilia, granuloma formation, migratory behaviour of second stage larvae in murine *Toxocara canis* infection. Effect of the inoculum size. *Parassitologia.*, 153(66), 2-3.
41. Rayes, A. A., and J. R. Lambertucci. 2001. Human toxocariasis as a possible cause of eosinophilic arthritis. *Rheumatology* 40:109–110.

42. Prunier, F., S. Delpine, and J. Victor. 2001. Löffler's fibroblastic endocarditis. A report of a case complicating toxocariasis. *Arch. Maladies Cour Vaisseau* 94:226–230.
43. Espinoza Y, Huapaya P, Huiza A, Sevilla C, Chávez V, Alva P. Estandarización de la técnica de ELISA para diagnóstico de Toxocariosis humana. *Anal Fac Med*. 2003;(1):7-12
44. Noh Y, Hong ST, Yun JY, Park HK, Oh JH, et al. (2012) Meningitis by *Toxocara canis* after ingestion of raw ostrich liver. *J Korean Med Sci* 27: 1105-1108.
45. Hill IR, Denham DA, Scholtz CL (1985) *Toxocara canis* larvae in the brain of a British child. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 79: 351-354.
46. Poulsen CS, Skov S, Yoshida A, Skallerup P, Maruyama H, et al. (2015) Differential serodiagnostics of *Toxocara canis* and *Toxocara cati*—is it possible? *Parasite Immunol* 37: 204-207.
47. Finsterer J, Auer H (2007) Neurotoxocarosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 49: 279-287.
48. Quattrocchi G., Nicoletti A, Marin B. Bruno E., Druet-Cabanac M, et al (2012). Toxocariasis and epilepsy: systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1775.
49. Deshayes S, Bonhomme J, de La Blanchardiere A (2015) Neurotoxocarosis: A Literature Review. *Trop Med Surg* 3: 190. doi: 10.4172/2329-9088.1000190
50. Vidal JE, Sztajnbok J, Seguro AC (2003) Eosinophilic meningoencephalitis due to *Toxocara canis*: case report and review of the literature. *Am J Trop Med Hyg* 69: 341-343.
51. Hill IR, Denham DA, Scholtz CL. 1985: *Toxocara canis* larvae in the brain of a British child. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 79:351–354.
52. Elisabeth Janecek, Andreas Beineke, Thomas Schnieder, Christina Strube (2014). Neurotoxocarosis: marked preference of *Toxocara canis* for the cerebrum and *T. cati* for the cerebellum in the paratenic model host mouse. *Parasites & Vectors*. 7:194

53. Celia Holland, H. V. Smith. 2006. *Toxocara: The Enigmatic Parasite*. CABI. 1:313
54. Burren, C.H., 1972. The distribution of *Toxocara canis* larvae in the central nervous system of rodents. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 66, 937–942.
55. Worley G, Green J, Frothingham T, Sturmer R, Walls K, Pakalnis V, Ellis G: *Toxocara canis* infection: clinical and epidemiologic associations with seropositivity in kindergarten children. *J Infect Dis* 1984; 149:591-597.
56. Huminer D, Symon K, Groskopf I, Pietrushka D, Kremer I, Schantz PMet al. 1992. Seroepidemiologic study of toxocariasis and strongyloidiasis in institutionalized mentally retarded adults. *Am J Trop Med Hyg* 1992;46:278-81.
57. Kaplan M, Kalkan A, Kuk S, Demirdag K, Ozden M, Kilic SS, 2008. *Toxocara* seroprevalence in schizophrenic patients in Turkey. *Yonsei Med J* 2008;49:224-9
58. Nilda Ester Radman, Susana Mónica Archelli, Lola Burgos, Reynaldo Domingo Fonrouge, †Mónica del Valle Guardis. 2006. *Toxocara canis* en caninos. Prevalencia en la ciudad de La Plata. *Acta bioquím. clín. latinoam.* v.40 n.1 La Plata ene./mar.
59. Schantz, P. M., D. Meyer, and L. T. Glickman. 1979. Clinical, serologic, and epidemiologic characteristics of ocular toxocariasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28:24–28.
60. Gavignet, B., Piarroux, R., Aubin, F., Millon, L., Humbert, P., 2008. Cutaneous manifestations of human toxocariasis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 59, 1031–1042.
61. Gillespie, S.H., Dinning, W.J., Voller, A., Crowcroft, N.S., 1993b. The spectrum of ocular toxocariasis. *Eye (Lond.)* 7 (Pt 3), 415–418.
62. Liotet, S., Bloch-Michel, E., Petithory, J.C., Batellier, L., Chaumeil, C., 1992. Biological modifications of the vitreous in intraocular parasitosis: preliminary study. *Int. Ophthalmol.* 16, 75–80.

63. Magnaval, J.F., Michault, A., Calon, N., Charlet, J.P., 1994. Epidemiology of human toxocariasis in La Reunion. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88, 531–533.
64. Nichols, R.L., 1956. The etiology of visceral larva migrans. I. Diagnostic morphology of infective second-stage *Toxocara* larvae. *J. Parasitol.* 42, 349–362.
65. De Savigny DH, Voller A, Woodruff AW. 1979. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. *J Clin Pathol.*;32(3):284-88.
66. Magnaval JF, Glickman LT, Dorchies P, Morassin B. 2001. Highlights of human toxocariasis. *Korean J Parasitol*;39(1):1-11.
67. Mohamad S, Azmi NC, Noordin R. 2009. Development and evaluation of a sensitive and specific assay for diagnosis of human toxocariasis by use of three recombinant antigens (TES-26, TES-30USM, and TES-120). *J Clin Microbiol.*;47(6):1712-17.
68. Pawlowski Z. 2001. Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. *J Helminthol.* 1;75(4):299-305.
69. Magnaval JF, Fabre R, Maurières P, Charlet JP, de Larrard B 1991;. Application of the western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitol Res.* 77(8):697-702.
70. Dziemian E, Zarnowska H, Kołodziej-Sobocińska M, Machnicka B, 2008. Determination of the relative avidity of the specific IgG antibodies in human toxocariasis. *Parasite Immunol.*;30(3):187-90.
71. Li MW, Lin RQ, Chen HH, Sani RA, Song HQ, Zhu XQ. 2007. PCR tools for the verification of the specific identity of ascaridoid nematodes from dogs and cats. *Mol Cell Probes.*;21(5-6):349-54.
72. Small, K. W., B. W. McCuen, E. De Juan, and R. Machemer. 1989. Surgical management of retinal retraction caused by toxocariasis. *Am. J. Ophthalmol.* 108:10–14.
73. Hotez, P. J. 1995. *Toxocara canis*, p. 683–684. In F. D. Burg, E. R. Wald, J. R. Ingelfinger, and P. A. Polin (ed.), *Gellis and Kaganis current pediatric therapy*, 15th ed. W. B. Saunders Pubs., Philadelphia, Pa.

74. Overgaauw P. A. (1997). Aspects of *Toxocara* epidemiology: Toxocarosis in dogs and cats. *Crit. Rev. Microbiol.* 23: 233-25_.
75. Barriga O. O. (_988). A critical look at the Importance, prevalence and control of Toxocariasis and the possibilities of immunological control. *Vet. Parasitol.* 29: _95-234.
76. Heymann D. L. & American Public Health Association (2004). Control of communicable diseases manual: An official report of the american public health association. _8th Edn. American Public Health Association, Washington DC, USA.
77. Manson P., Cook G. C. & Zumla A. (2003). Manson's tropical diseases. 2_st Edn. Saunders, London, UK.
78. Acha P. N. & Szyfres B. (200_). Zoonoses and Communicable diseases common to man and animals. 3rd Ed. PanAmerican Health Organization, Pan American Sanitary Bureau, Regional Office Of The World Health Organization, Washington, D.C., U.S.A.
79. Delgado, O., Blanca, I., Silva, S., Coraspe, V., Perez, A. & Marquez M. E. (2000). Toxocariasis humana: Estudio de dos grupos de pacientes con diferentes formas clínicas. XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología, São Paulo, Brasil.
80. Delgado O. & Rodríguez-Morales A. 2009. Aspectos clínico-epidemiológicos de la toxocariasis: una enfermedad desatendida en Venezuela y América Latina. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental* . Vol. XLIX, No _, Enero-Julio, 2009
81. Yang MY, Chuang H, Chen RF, Yang KD 2002. Reversible phosphatidylserine expression on blood granulocytes related to membrane perturbation but not DNA strand breaks. *J Leukoc Biol*;71:231–237. [PubMed: 11818443]
82. Garrido C, Kroemer G, 2004. Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins. *Curr Opin Cell Biol*;16:639–646. [PubMed: 15530775]

83. Cohen GM. 1997; Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326(Part 1):1–16. [PubMed: 9337844]
84. Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, et al. 2005. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*;12 (Suppl 2):1463–1467. [PubMed: 16247491]
85. G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Vandenabeele, et al. 2009. Classification of cell death. *National Institute of Health*. 16(1): 3–11. doi:10.1038/cdd.2008.150.
86. Lockshin, R. A., and Z. Zakeri. 2004. Apoptosis, autophagy, and more. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36:2405–2419.
87. Danial NN, Korsmeyer SJ. 2004. Cell death: critical control points. *Cell*; 116:205-19.
88. Locksley, R. M., Killeen, N., and Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487– 501.
89. Conradt B, Xue D. 2005. Programmed cell death. *WormBook*; 6:1-13.
90. Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P. E., Didelot, C., and Kroemer, G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 13, 1423–33.
91. Hill, M. M., Adrain, C., Duriez, P. J., Creagh, E. M., and Martin, S. J. (2004). Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf- 1 apoptosomes. *Embo J* 23, 2134–45.
92. Susin, S. A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Costantini, P., Ferri, K. F., Irinopoulou, T., Prevost, M. C., Brothers, G., Mak, T. W., Penninger, J., Earnshaw, W. C., and Kroemer, G. (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 192, 571–80.
93. Rubio-Moscardo, F., Blesa, D., Mestre, C., Siebert, R., Balasas, T., Benito, A.
94. Rosenwald, A., Climent, J., Martinez, J. I., Schilhabel, M., Karran, E. L., Gesk, S., Esteller, M., deLeeuw, R., Staudt, L. M., Fernandez-Luna, J. L., Pinkel, D., Dyer, M. J., and Martinez-Climent, J. A. (2005). Characteri-

- zation of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood* 106, 3214–22.
95. Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14, 5579–88.
 96. Slee, E. A., Adrain, C., and Martin, S. J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 276, 7320–6.
 97. Xhang, G. and Gurlu, V. (1997) Detection of early-stage apoptosis in three adherent mammalian cell lines using the ApoAlert Annexin V Apoptosis Kit. *Clone- techniques XII*, 24,25.
 98. Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben-Sasson, S. A. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119, 493–501.
 99. Zhang, Z. and Galileo, D. (1997) Direct in situ end-labeling for detection of apoptotic cells in tissue sections. *Biotechniques* 22, 834–836.
 100. Mitra, G. (1996) Detection of apoptotic cells. *Promega Notes Mag.* 57, 10–15.
 101. Mizushima, N. (2011). Autophagy in protein and organelle turnover. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 76, 397-402.
 102. Golstein P, Kroemer G. 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*;32:37–43. [PubMed: 17141506]
 103. Baehrecke EH. 2005. Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol*;6:505–510. [PubMed: 15928714]
 104. Tasdemir E, Galluzzi L, Maiuri MC, Criollo A, Vitale I, Hangen E, et al. 2008. Methods for assessing autophagy and autophagic cell death. *Methods Mol Biol*;445:29–76. [PubMed: 18425442]

105. Degtarev A, Hitomi J, Germscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, et al. 2008. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol*;4:313–321. [PubMed: 18408713]
106. G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Vandenabeele. Et al. 2009. Classification of cell death. *Cell Death Differ.* 16(1): 3-11.
107. Bergsbaken, T., Fink, S., Cookson, B. 2009. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbio.* 7 (2): 99-109
108. Bienvenu, A. Gonzale E., Picot, S. 2010. Apoptosis induced by parasitic disease. *Parasites & Vectors.* 3:106
109. Zhang J, Andrade ZA, Andrade S, Takeda K, Sadigursky M & Ferrans VJ (1997). Ap- optosis in a canine model of acute cha- gasic myocarditis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,* 92 (Suppl I): 107
110. Alderson MR, Tough TW, Davis-Smith T, Braddy S, Falk B, Schooley KA, Goodwin RG, Smith CA, Ramsdell F & Lynch DH (1995). Fas ligand mediates activation-in- duced cell death in human T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine,* 181: 71-77.
111. Nunes MP, Andrade RM, Lopes MF & DosReis GA (1998). Activation-induced T cell death exacerbates *Trypanosoma cruzi* replication in macrophages cocultured with CD4+ T lymphocytes from infected hosts. *Journal of Immunology,* 160: 1313- 1319.
112. Freire-de-Lima CG, Nunes MP, Corte-Real S, Soares MP, Previato JO, Mendonça- Previato L & DosReis GA (1998). Pro apoptotic activity of a *Trypanosoma cruzi* ceramide-containing glycolipid turned on in host macrophages by IFN-g. *Journal of Immunology,* 161: 4909-4916.
113. Hisaeda H, Sakai T, Ishikawa H, Maekawa Y, Yasutomo K, Good RA & Himeno K (1997). Heat shock protein 65 induced by gamma-delta T cells prevents apoptosis of macrophages and contributes to host defense in mice infected with *Toxo- plasma gondii*. *Journal of Immunology,* 159: 2375-2381.
114. Moore KJ & Matlashewski G (1994). Intra- cellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *Journal of Immunology,* 152: 2930-2937.

115. Medana IM, Idro R, Newton CR: 2007. Axonal and astrocyte injury markers in the cerebrospinal fluid of Kenyan children with severe malaria. *J Neurol Sci*, 15:93-98.
116. Lackner P, Burger C, Pfaller K, Heussler V, Helbok R, Morandell M, Broessner G, Tannich E, Schmutzhard E, Beer R: 2007. Apoptosis in experimental cerebral malaria: spatial profile of cleaved caspase-3 and ultrastructural alterations in different disease stages. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 33:560-571
117. Quan N, Mhlanga JD, Whiteside MB, McCoy AN, Kristensson K, Herkenham M. 1999: Chronic overexpression of proinflammatory cytokines and histopathology in the brains of rats infected with *Trypanosoma brucei*. *J Comp Neurol*, 414:114-1130.
118. Hsiao W. Et al. 2013. Biophysical analysis of astrocytes apoptosis triggered by larval E/S antigen from cerebral toxocarosis-causing pathogen *Toxocara canis*. *Anal Sci*. 2013;29(9):885-92.
119. Zheng S., Li, J. Shen Ji., Wang X. 2006. Apoptosis in cerebral histiocytes and the expression of apoptosis-related genes Bcl-2 y Bax in mice infected with *Toxocara canis*. *Chinesse Journal of Zoonoses*. 1002-2594. 04-0352-04.
120. *Germinal J., Campos F. 2002. Frecuencia de helmintos en intestinos de perros sin dueño sacrificados en la ciudad de Querétaro, Querétaro, México. Veterinaria México. 33. 003*
121. *Martínez I., Fernández A., Vázquez O., Ruiz, A. 1998. Frecuencia de Toxocara canis en perros y áreas verdes del sur de la ciudad de México, Distrito Federal. Veterinaria México. 29 (3)*
122. Oaks J., Kayes S., 1980. Artificial Hatching and culture of *Toxocara canis* second stage larvae. *Journal of Parasitology*. 65 (6): 969-970).
123. Bowman, D.D., Mika-Grieve, M., Grieve, R.B., 1987. Circulating excretory-secretory antigen levels and specific antibody responses in mice infected with *Toxocara canis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36, 75–82.

124. R. Maizels, D. D. Savigny, B. Ogilvie. (2007). Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. *Parasite Immunology*. 6 (1). 23-37
125. Wisam M. Al-Saeed, Hind J. Mahmoo. 2011. Pathological effect of *Toxocara canis* egg doses in experimental mice. *Bas.J.Vet.Res.Vol.10,No.1,2011*.
126. Strube C., Heuer L., Janecek E. (2013). *Toxocara* spp. Infections in paratenic hosts. *Veterinary Parasitology*. 93 (2013) 375–389
127. Havasiova-Reiterova K, Tomasovicova O, Dubinsky P. (1995): Effect of various doses of infective *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs on the humoral response and distribution of larvae in mice. *Parasitol Res*, 81:13-17.
128. Burren CH. 1971: The distribution of *Toxocara* larvae in the central nervous system of the mouse. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 65:450–453.
129. Maizels R. (2013). *Toxocara canis*: Molecular basis of immune recognition and evasion . *Vet Parasitol*. 2013 Apr 15; 193(4): 365–374.
130. J.D. Dunsmore, R.C.A. Thompson, I.A. Bates. (1983). The accumulation of *Toxocara canis* larvae in the brains of mice. *International Journal for Parasitology*. 13 (5). 517–521
131. Hollad C., Hamilton C. (2013). The significance of cerebral toxocarosis: a model system for exploring the link between brain involvement, behaviour and the immune response. *The Journal of Experimental Biology* 216, 78-83.
132. Chieffi PP, Aquino RT, Pasqualotti MA, Ribeiro MC, Nasello AG. (2010). Behavioral changes in *Rattus norvegicus* experimentally infected by *Toxocara canis* larvae. *Revista de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 52(5):243-6.
133. Holland CV, Cox DM. 2001: *Toxocara* in the mouse: a model for parasite-altered host behaviour? *J Helminthol*, 75:125-135
134. Jarrard L. (1993). On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behav. Neural. Biol.* 60(1): 9-25

135. K. Plessen, R. Bansal, H. Zhu. (2006). Hippocampus and amygdala morphology in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 63(7):795-807.
136. Burke M., Roberson E. 1985. Prenatal and lactational transmission of *Toxocara canis* and *Ancylostoma caninum*: Experimental infection of the bitch before pregnancy. *International Journal for Parasitology*. 15 (1). 71-75