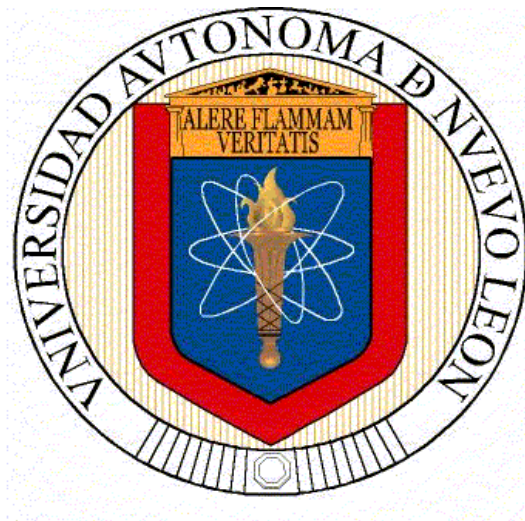


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**TESIS**

**MÉTODOS DE CRIOPRESERVACIÓN DE HUEVOS EMBRIONADOS  
DE *TOXOCARA CANIS***

**PRESENTA  
ALEJANDRA FLORES GONZÁLEZ**

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

**ESCOBEDO, N.L. MÉXICO DICIEMBRE 2014**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

POSGRADO CONJUNTO AGRONOMIA - VETERINARIA



MÉTODOS DE CRIOPRESERVACIÓN DE HUEVOS EMBRIONADOS  
DE *TOXOCARA CANIS*

**TESIS**  
QUE PRESENTA  
MVZ. ALEJANDRA FLORES GONZÁLEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIA ANIMAL

ESCOBEDO, N.L. MÉXICO

DICIEMBRE 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

POSGRADO CONJUNTO AGRONOMIA - VETERINARIA



MÉTODOS DE CRIOPRESERVACION DE HUEVOS EMBRIONADOS DE  
*TOXOCARA CANIS*

Aprobación de tesis por el Comité Particular de  
MVZ. Alejandra Flores González

---

Dr. Juan José Zarate Ramos  
Director de Tesis

---

Dr. Ramiro Avalos Ramírez  
Co- Director

---

Dra. Martha V. Garza Zermeño  
Asesor

---

Dra. Diana E. Ávila Zamora  
Asesor

## **DEDICATORIA**

Este trabajo y esfuerzo va dedicado principalmente a Dios, ya que me ha bendecido con la posibilidad de pertenecer a un grupo de personas que estudian la vida.

A mis padres, a quienes amo con todo el corazón y siempre estaré agradecida por su apoyo incondicional y su excelente manera de demostrarme cada día que somos capaces de lograr nuestras metas. Sus consejos y fuerza para sacar adelante a sus hijos es un ejemplo a seguir. Tengo los mejor padres que Dios me pudo dar.

A mis hermanos, quienes me dejan compartir mis obstáculos y triunfos, que me apoyan hasta en lo más mínimo. Los amo.

Y a mi ahora prometido, Hugo, que desde hace ya 10 años ha demostrado ser paciente y comprensivo con todo lo relacionado a mi profesión, que me ha ayudado los momentos más difíciles de mi vida y que apoya incondicionalmente, eres definitivamente la bendición más bella que Dios me pudo mandar. Gracias amor de vida.

## **Agradecimientos**

Al Dr. Juan Zárate a quien admiro y respeto, y me dio la oportunidad de trabajar bajo su asesoría, y no solo eso sino que aumento mi gusto por la ciencia y parasitología.

Al Dr. Ramiro Avalos, que con mucha paciencia y tranquilidad me ayudo y apoyo con todas mis dudas y me enseñó que todo es posible si se hace de la manera adecuada.

A la Dra. Diana Zamora, que no solo es una persona ejemplar, sino también un ejemplo a seguir por su humildad y su manera de apoyar a todos los alumnos que llegan a que los ayuden. Dra., la admiro.

Dr. Mario y Dra. Vicky que son las personas que más me han inspirado a superarme profesional y personalmente. Sin su asesoría no podría haber cumplido estas metas y menos siquiera pensar en lograrlo gracias por su paciencia y apoyo. Definitivamente son un ejemplo a seguir, no solo como maestros y veterinarios, sino como profesionistas y excelentes personas en general. Espero seguir creciendo junto a ustedes.

A mis compañeros de generación, Dra. Vero, Jorge, Benito, Vladimir, Nydia, Estela, Nelson, Tony, y el Doc. Mike. Nadie más que ustedes entienden lo difícil pero divertido que fue hacer esta Maestría. Los llevare en mi corazón siempre.

## Abreviaturas

PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
DMSO	Dimetil Sulfóxido
CPA	Crioprotectores
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo) -2,5-difeniltetrazol
L2	Larva etapa 2
L3	Larva etapa 3
SNC	Sistema Nervioso Central
LMV	<i>Larva migrans viseral</i>
iONS	Óxido nítrico sintetasa
PROH	Propaneidol

## INDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
<b>RESUMEN</b>	viii
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1. Objetivo general	3
1.2. Objetivos específicos	3
1.3. Hipótesis	4
1.4. Justificación	4
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	5
2.1. <i>Toxocara canis</i>	5
2.1.1. Características Morfológicas	6
2.1.2. Ciclo de vida de <i>Toxocara canis</i>	6
2.1.3. Aspectos clínicos	9
2.1.4. <i>Larva migrans visceral</i>	9
2.1.5. Toxocariosis y su efectos en tejidos	10
2.2. Criopreservación	13
2.2.1. Transporte a través de las membranas durante la congelación y descongelación	16
2.2.2. Métodos de criopreservación	17
2.2.3. Agentes crioprotectores (CPA)	18
2.2.3.1. Los crioprotectores penetrantes	18
2.2.3.2. Agentes crioprotectores no penetrantes	20

<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	21
3.1. Obtención de adultos de <i>Toxocara canis</i>	21
3.2. Extracción de huevos y conteo por la Técnica de Mc Máster	22
3.3. Estandarización de técnica de maduración de huevos de <i>Toxocara canis</i>	22
3.4. Criopreservación	23
3.5. Análisis de la viabilidad celular por Azul Tripán	25
3.6. Ensayo de viabilidad celular con MTT	25
3.7. Modelo de infección experimental	26
3.8. Técnica de Trichinoscopía	26
3.9. Extracción de ADN y detección de <i>T. canis</i> por PCR	27
<b>4. RESULTADOS</b>	29
4.1. Obtención de huevos de <i>Toxocara canis</i>	29
4.2. Estandarización de métodos de cultivo para el desarrollo de huevos de <i>Toxocara canis</i>	31
4.3. Criopreservación de huevos de <i>Toxocara canis</i> utilizando DMSO, Glicerol y combinación Glicerol/DMSO	33
4.4. Evaluación de viabilidad con Azul de Tripano	34
4.5. Ensayo de viabilidad celular con MTT	35
4.6. Análisis de la capacidad infectante y migratoria por la técnica de Trichinoscopia	37
4.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR para detección de <i>T. canis</i>	39
<b>5. DISCUSIÓN</b>	41
<b>6. CONCLUSIONES</b>	43
<b>7. LITERATURA CITADA</b>	44



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de crioprotectores	23
Tabla 2. Cantidad de soluciones mezcladas en cada microtubo	24
Tabla 3. Evaluación de métodos de cultivo para el desarrollo de huevos de <i>Toxocara canis</i>	31
Tabla 4. Cantidad de huevos teñidos larvados, no larvados y vacíos después de la criopreservación con la tinción de azul de tripán.	34
Tabla 5. Cantidad de huevos teñidos larvados, no larvados y vacíos después de la criopreservación con la tinción de MTT	36
Tabla 6. Número de larvas encontradas en 0.1 gr de órganos extraídos de los ratones infectados experimentalmente.	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida <i>Toxocara</i>	8
Figura 2. Fotomicrografías de las secciones del cerebro en la región del diencefalo	11
Figura 3. Nefritis granulomatosa, riñón, corteza	12
Figura 4. Adulto de <i>Toxocara canis</i> encontrado en intestino de cachorro	29
Figura 5. Se muestra la extracción de huevos directamente de un hembra madura, dentro de una caja de petri con solución salina fisiológica.	30
Figura 6. Huevos de <i>Toxocara canis</i> después de 2 semanas de incubación en hidróxido de sodio	32
Figura 7. Evaluación de los 12 tratamientos para la congelación de huevos, considerando movimiento y morfología	33
Figura 8. Huevos descongelados de <i>Toxocara canis</i> evaluados con MTT que muestran actividad mitocondrial.	35
Figura 9. Numero de larvas encontradas en cerebro, ojo, músculo, e hígado de 10 ratones infectados experimentalmente con huevos larvados de <i>Toxocara canis</i> .	37
Figura 10. Cerebro de ratón infectado experimentalmente	38
Figura 11. Electroforesis de los productos amplificados por PCR en el gradiente de temperatura para <i>T.canis</i>	39
Figura 12. Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de amplificación del gen ITS-2 de <i>T. canis</i>	40

## RESUMEN

La toxocariosis es una enfermedad infecciosa de distribución mundial que afecta a perros de todas las edades pero principalmente a los cachorros. Su fase larvaria posee la capacidad de infectar a los seres humanos causando enfermedades y en ocasiones puede tener un desenlace fatal, la aproximación de este parásito con el ser humano se incrementa debido a la convivencia de las personas con cachorros parasitados. *Toxocara canis* es un parásito de la familia Ascaroidea con una actividad migratoria importante. Los investigadores en el tema de la Toxocariosis humana y animal, requieren de una fuente constante y segura de material infeccioso (huevos viables y larvados) listos para ser utilizados en experimentación. Por esta razón, encontrar una técnica para preservar huevos infecciosos de este parásito es un punto crítico en los trabajos de investigación, para lo cual en el presente trabajo se estandarizó la obtención y desarrollo de huevos infectantes de *T. canis* a partir de adultos, encontrándose que la solución de hidróxido de sodio al 10% es apta para el desarrollo de los huevos de parásitos sin presentar contaminación desde los 7 días. Para la crio preservación de los huevos se probaron 12 tratamientos con diferentes concentraciones de los agentes crioprotectores Glicerol y Dimetil Sulfoxido, seleccionándose Glicerol al 10% y Dimetil Sulfoxido (DMSO) al 5%. Se analizó la viabilidad de los huevos utilizando el colorante de exclusión azul tripán y MTT para actividad metabólica de la larva y se determinó que con el tratamiento DMSO 5% se alcanzó el mayor porcentaje de viabilidad (71%) y un 57% de huevos larvados.

Finalmente se analizó la capacidad infectiva y migratoria de los huevos después de los tratamientos de criopreservación en un modelo murino realizando una infección experimental en ratones de la cepa BALB/C. Para comprobar la infección se realizaron análisis por triquinoscopía de diversos tejidos como cerebro, hígado y pulmón, encontrándose la presencia de larvas en éstos organos en los ratones infectados con los huevos criopreservados.

Se confirmó la presencia del parásito en los tejidos de un ratón infectado con huevos criopreservados con DMSO al 5% mediante PCR detectando el gen ITS-2 de *T.canis*.

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran la factibilidad de criopreservar los huevos infectantes de *Toxocara canis*, conservando su viabilidad y capacidad infectante y migratoria, lo cual será de gran utilidad para contar con éste material disponible para el establecimiento de modelos experimentales.

## 1. Introducción

El camino por el cual el parásito *Toxocara canis* infecta a su hospedador definitivo, el canino, depende de la ruta migratoria del parásito cuando éste se encuentra en su etapa larvaria, esto se considera que está relacionado con la edad y el estado inmune del hospedador. *Toxocara Canis* es uno de los helmintos intestinales más comunes encontrados en los caninos domésticos y en caninos salvajes. El estado hormonal e inmunológico del animal, así como la raza y género son otros factores que se consideran críticos para la migración larvaria del parásito (Biologics, 2005). Las larvas enquistadas en los tejidos de la madre son reactivadas durante la preñez y la lactancia; la migración larvaria en cachorros por vía transplacentaria es de 98% mientras que la vía lactogénica es de un 1.5% y a los recién nacidos durante la lactancia un 1.5%. Sin embargo, los mecanismos que desencadenan la reactivación de las larvas no están completamente dilucidados. Como sabemos *Toxocara canis* tiene la capacidad migratoria que le permite infectar a la madre de los cachorros de manera que cuando éstos nacen ya están infectados o se infectan de manera temprana, permitiendo la diseminación del parásito en nuevos hospederos, permitiendo que continúe la reproducción del parásito. Los cachorros infectados transplacentariamente pueden empezar a expulsar huevos alrededor de 3 semanas después de su nacimiento. Mientras que por el método de infección vía lactogénica, el periodo de pre latencia es de 4 semanas.

En Febrero del año 2013, el Gobierno Federal de México, bajo la Ley General de Salud, prohibió el uso de la piperazina como agente antihelmíntico en general debido a que puede ser usado como sustancia psicotrópica., por tal motivo el uso de éste fármaco para la recolección de adultos de *Toxocara canis* es ahora muy complicado. El método de extracción directa de intestino delgado es una opción adecuada solo cuando los animales han sido sacrificados recientemente, por lo que se hace necesario estandarizar la técnica de obtención y desarrollo de huevos infectantes y analizar técnicas de crio preservación de los mismos que permitan obtener una buena viabilidad

celular y conservar la capacidad infectante y migratoria para poder ser utilizados en modelos experimentales futuros. En este estudio se probaron dos agentes crioprotectores: Glicerol y DMSO y se evaluó la viabilidad celular con azul de tripano, el cual se utiliza en tinciones histológicas y permite diferenciar células vivas de células muertas, analizando la integridad de la membrana de los huevos criopreservados, de igual forma se utilizó el ensayo basado en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la actividad mitocondrial. La capacidad infectante y migratoria de los huevos crio preservados se analizó en un modelo murino de infección a través de la técnica de trichinoscopia y PCR.

### **1.1. Objetivo general**

Evaluar la técnica de la criopreservación como medio que permita mantener la capacidad infectante y migratoria de huevos embrionados de *Toxocara Canis*.

### **1.2 Objetivos específicos**

1. Estandarizar la obtención y desarrollo de huevos infectantes de *Toxocara canis*.
2. Evaluar la eficacia del DimetilSulfóxido (DMSO) y el Glicerol como agentes criopreservadores de huevos larvados de *Toxocara canis*.
3. Analizar la viabilidad de los huevos criopreservados de *T.canis* utilizando el colorante de exclusión Azul de Tripán y el ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)
4. Analizar “*in vivo*” la viabilidad de huevos criopreservados de *T.canis* a través de su capacidad infectante y migratoria usando la Técnica de trichinoscopía.
5. Detectar la presencia de larvas de *T.canis* en tejidos de ratones infectados por PCR.

### **1.3 Hipótesis**

Es factible realizar la criopreservación de huevos embrionados de *Toxocara canis* y que éstos permanezcan viables conservando su capacidad infectiva y migratoria.

### **1.4 Justificación**

*Toxocara canis* es uno de los geohelminintos de mayor interés en salud pública, afecta a caninos en todo el mundo y posee un alto potencial zoonótico, motivo por el cual su estudio es de gran importancia, es fundamental contar con un método para preservar material biológico (huevos embrionados) que evite o minimice la alteración metabólica de *Toxocara canis*; para que de esta manera se puedan utilizar en estudios que permitan comprender las distintas fases de su ciclo vital y su asociación con las alteraciones que induce en humanos y animales domésticos.



## 2. Revisión de literatura

### 2.1 *Toxocara canis*

Invasión visceral, neurotoxocariosis, desprendimiento de retina, daño en nervio óptico, taponamiento cardiaco y pulmonar; son algunas de las patologías causadas por un parásito llamado *Toxocara spp.* Descubierta por Werner en 1782 (Webster), *Toxocara spp* fue clasificado dentro de la clase: *Secernentea*, subclase: *Rhabditia*, orden: *Ascaridida*, suborden: *Ascaridina*, superfamilia: *Ascaridoidea*, familia: *Ascarididae*, género: *Toxocara* y además encontramos diferentes especies que son: *T. canis*, *T. cati*, *T. vitolorum*. Estas especies se diferencian morfológicamente y principalmente por su hospedador definitivo. *Toxocara canis* es uno de los parásitos gastrointestinales más comunes que afecta al canino tanto salvaje como doméstico. Durante años este parasito se ha ido adaptando para garantizar su supervivencia y transmisión a sucesivas generaciones tanto en su hospedador definitivo como en los paraténicos.

En el país hay nueve millones de mascotas, son dos millones de perros y siete millones de gatos de los cuales 10% viven y defecan al aire libre. La ley de Cultura Cívica del Distrito Federal en su artículo 5 fracción 16, establece que los dueños de las mascotas deben prevenir que hagan daño o molesten a los vecinos, dentro de la cual cabe el hecho que los dueños deben recoger las heces de sus mascotas como una acción de promoción a la salud.

Se sabe que en las ciudades, éstas mascotas producen alrededor de media tonelada de heces fecales diariamente. El excremento de perro que se dejan en la calle se seca y pulveriza, éstas partículas son levantadas por aire llevando microorganismos que afectan la salud.(Salud, 2014)

### **2.1.1 Características Morfológicas**

Para poder distinguir *T. canis* de *T. cati* y alguna otra especie, es importante considerar la forma y longitud de los adultos observando los labios, las aletas cervicales, los órganos reproductores de las hembras y la longitud de las espículas.

El huevo de *T. canis* mide de 60 a 85 micras de diámetro, es rugoso con una cubierta irregular el protoplasma parece granuloso cuando no está embrionado.

### **2.1.2 Ciclo de vida de *Toxocara canis***

Los perros son los hospedadores definitivos de esta especie, sin importar la raza pero es importante considerar la edad. Un ejemplo es que *T. canis* se transmite vía intrauterina y lactogénica en el perro, y normalmente éstos son infectados mediante la ingestión de huevos que se encuentran en el medio ambiente o por la ingestión de algún hospedador intermediario que contenga el parásito adulto o larva. Otra manera en la cual el ciclo puede estar afectando camadas de cachorros es que si la madre estuvo infectada durante la gestación y la lactancia los cachorros al nacer excretan huevos o larvas por las heces y la madre se infecta de nuevo. (P. A. Overgaauw, 1997)

La infección por *Toxocara canis* en perros ocurre principalmente de las siguientes maneras: intrauterina, lactogénica, ingestión de huevos embrionados que se encuentran en el ambiente, ingestión de larvas excretadas en las heces por cachorros recién nacidos e ingeridos por la madre o por un huésped paraténico. Hay cuatro reservorios epidemiológicos: infección intestinal del huésped definitivo (el perro), huevos infectivos en el ambiente, larvas en huésped paraténico como la rata, y larvas en tejidos somáticos en el huésped. (Schnieder, Laabs, & Welz, 2011)

Algunos hospedadores paraténicos son zorros, aves, roedores y humanos, que pueden ser infectados por accidente ya que el parásito sobrevive por largos periodos de tiempo en el suelo (Despommier, 2003).

Muchos estudios han utilizados diferentes tipos de animales para evaluar la eficacia del parásito en su infección y migración a diferentes tejidos como en ratones, (Dunsmore, Thompson, & Bates, 1983) monos, (Tomimura, Yokota, & Takiguchi, 1976), conejos (Dzbencki, Hautz, & Bitkowska, 2001) y cerdos (Sommerfelt et al., 2004), estos modelos son propiamente utilizados para estudiar la toxocariosis.

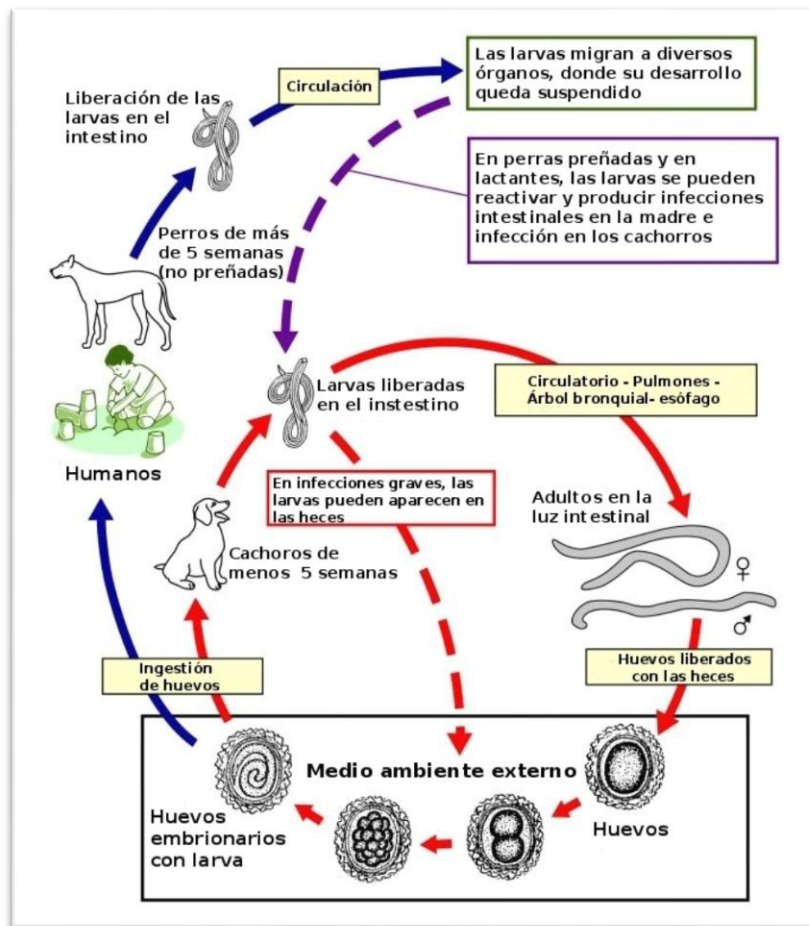
Los gusanos adultos viven aproximadamente 4 meses en intestino delgado del canino y cada hembra de *Toxocara canis* adulta llega a producir hasta 200 000 huevos por día. Los huevos de *T. canis* salen junto con las heces y se dispersan en el medio ambiente donde se encuentre el perro, las condiciones para su supervivencia tiene que ser óptimas, como una humedad relativa de 80%, oxigenación, y temperaturas de 24°C a 37°C.

Pero estos huevos producidos aun no son embrionados y por lo tanto no son infectivos para ninguna especie. Los cachorros son considerados como los principales excretores de huevos, esto por medio de las heces excretadas, cuando están en la edad de 3 semanas hasta que llegan a los 3 meses en donde se ha reportado que llegan a excretar hasta 15 000 huevos por gramo de heces.

El ciclo biológico de *Toxocara canis* inicia con los huevos (Fig. 1) cuando están en el suelo y llegan a ser embriones a partir de que pasan de 2 a 6 semanas, después son los que son capaces de infectar a los perros y a otros hospedadores. Los huevos embrionados pasan al duodeno en donde eclosionan y liberan larvas en etapa dos (L2) éstas atraviesan la pared duodenal y alcanzan el hígado, a través del sistema circulatorio y llegan al corazón y a los pulmones, después descienden por el tracto respiratorio, pero en esta etapa ya son consideradas larvas tipo 3 (L3). Estas pasan por vía linfática o sanguínea a ganglios, tráquea, faringe y son deglutidas y llegan de nuevo al intestino delgado donde pasan a la

cuarta maduración y es considerada larva adulta. Pero en los adultos este ciclo se cierra en muy pocos casos debido a que las L2 son las que tiene actividad migratoria y se quedan en los tejidos (Quiroz, 2005)

Cuando un perro o zorro ingiere tejidos que están contaminados con el parásito en larva 2, (Huevo embrinado) ésta pasa a intestino en donde se desarrolla y llega a su madurez sexual en estado adulto, así es como pasados 30 días comienza a eliminar huevos junto con las heces.



**Figura 1. Ciclo de vida de *Toxocara canis*.** Los cachorros a partir de las 5 semanas empiezan a liberar huevos de adultos en intestino junto con las heces, éstos pasan a hospedadores paraténicos como el humano y migran a diferentes órganos o tejidos o regresan a su hospedador definitivo: el canino. (DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern, Center of Disease Control and Prevention, 2013).

### **2.1.3 Aspectos clínicos**

El daño causado por *T. canis* al hospedador puede variar así como los signos y síntomas detectados. Todo depende de que tejido ha sido invadido; el hígado (Hamilton, Brandes, Holland, & Pinelli, 2008; Taira, Saeed, Permin, & Kapel, 2004), el sistema nervioso central (SNC), los pulmones (Elena Pinelli et al., 2007) y los ojos (Paola, 2009) son aparentemente los más comúnmente afectados.

Es importante considerar que la cantidad de larvas migratorias y la edad del hospedador son dos factores que se deben considerar para tener una idea de la gravedad las lesiones. Las consecuencias patológicas van a depender de la muerte de las larvas, ya que su muerte inicia una respuesta de hipersensibilidad retardada o inmediata produciendo síntomas característicos de *larva migrans visceral* (LMV).

### **2.1.4 Larva migrans visceral**

El patrón de migración es parecido en el hospedador definitivo y en el paraténico, sin embargo depende de la especie afectada. Normalmente la larva eclosiona después de entrar al hospedador, penetra a la pared intestinal, y durante la fase migratoria hepato-pulmonar viaja por circulación sanguínea hacia el hígado y después los pulmones. A partir de ese momento continúan la migración hacia el sistema circulatorio y viajan hacia las diferentes viseras dependiendo de la especie predilecta (Magnaval, Glickman, Dorchies, & Morassin, 2001). Después de esto, se quedan en el tejido por un extenso periodo de tiempo. Se han encontrado larvas encapsuladas viables de hasta 10 años (Strube, Heuer, & Janecek, 2013). De esta manera esperan ser consumidas por su hospedador definitivo para poder completar su ciclo de vida.

Las rutas de migración, así como los sitios predilectos para la larva van a depender de la especie hospedera, sin embargo casi todos los órganos serán afectados con una diferencia de cantidad de larvas presentes. En el hospedador

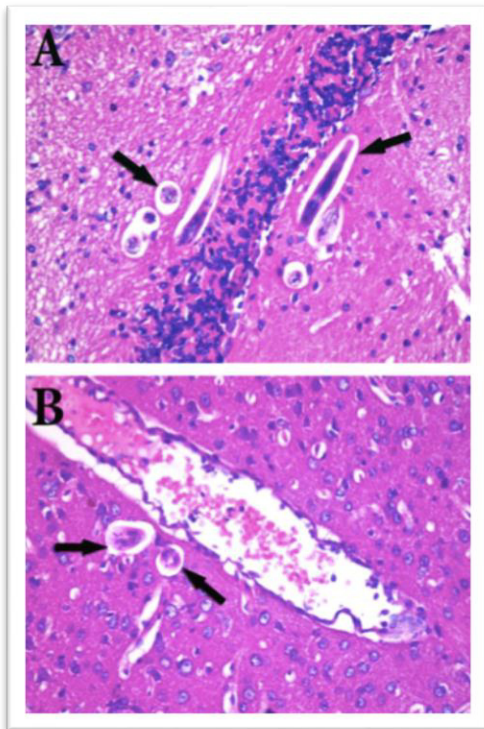
paraténico *T. canis* muestra una afinidad por el SNC ya sea el cerebro o los ojos, (Nobuaki, 2006) una teoría es que el grado de aporte sanguíneo de cada órgano juega un papel importante en la distribución de las larvas al igual que la comparación en tamaños, *T. canis* es más grande que *T. cati* y es por eso que se piensa que *T. canis* queda atrapada en cerebro más comúnmente que en otros órganos y que la prevalencia de *T. cati* en cerebro es menor, ya que *T. cati* puede regresar a circulación pasando por arteriolas (Dunsmore et al., 1983).

La larva de *Toxocara canis* puede evadir o resistir la fagocitosis por neutrófilos y macrófagos, o una vez que entraron a estas células, pueden prevenir la fusión de los lisosomas. Estos organismos normalmente no producen moléculas biológicas que causan un daño severo al tejido, pero su continua presencia incita a una inflamación crónica y una respuesta inmune. La destrucción de tejido, inflamación granulomatosa y fibrosis son secuelas comunes. Algunos granulomas eosinofílicos son provocados por la capacidad del parásito de migrar a otros tejidos. La saliva y las heces del parásito son antígenos. En perros, la reacción del tejido a esto es una hiperplasia de células epiteliales, que resulta en una proliferación de la mucosa antral. A veces se presenta una obstrucción pilórica (James & Donald, 2007; Zachary & McGavin, 2011).

### **2.1.5 Toxocariosis y su efecto en los tejidos.**

Las citocinas juegan un papel importante en la inmunopatología de la neurotoxocariosis, así como para la migración del parásito hacia el pulmón, y a pesar de que éstas citocinas son importantes para la inflamación como la IL-6 y el TNF, éstas no han sido estudiadas en la infección por *Toxocara*. Pero una cuantificación relativa de la expresión genética en el cerebro de ratones infectados muestra un incremento en la expresión de IL-5, IL-10, IFN-gamma y óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) (Hamilton et al., 2008). La neurotoxocariosis ha sido diagnosticada más frecuentemente gracias al implemento de nuevas técnicas diagnósticas, a veces esta enfermedad se confunde con meningoencefalitis

eosinofílica. Por otra parte muchos estudios han asociado la epilepsia con *T. canis*, así como su influencia en la actividad de neurotransmisores. La migración larvaria se presenta hacia el parénquima del encéfalo, principalmente cerca del plexo coroideo y el cuerpo calloso, pero se han encontrado menos larvas en el área del cerebelo (Othman, Abdel-Aleem, Saied, Mayah, & Elatrash, 2010). En la Figura 2 se muestra que no hay reacción inflamatoria visible alrededor de la migración de las larvas a excepción de una congestión vascular.

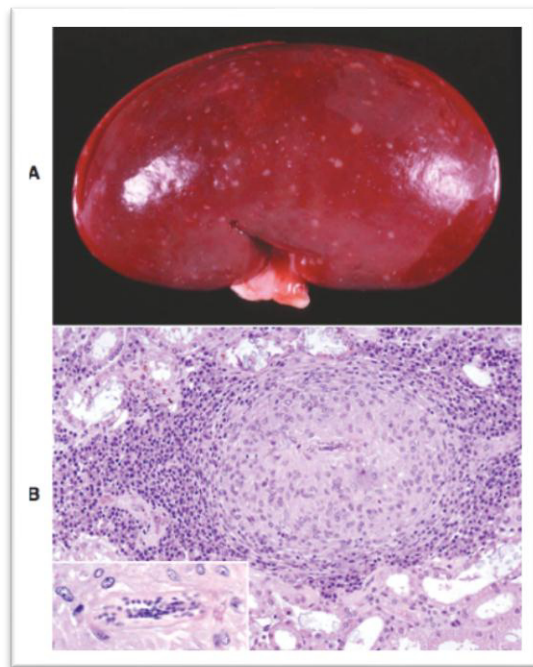


**Figura. 2- Fotomicrografías de las secciones del cerebro en la región del diencefalo que muestra: (A) numerosos perfiles tangenciales y de la sección transversal de larvas de *Toxocara* "flechas" depositados dentro del tejido cerebral y (B) congestión vascular adyacente a las larvas (H & E X400). (James & Donald, 2007; Zachary & McGavin, 2011).**

La gastroenteritis multifocal eosinofílica causada por la migración de *Toxocara canis* es una enfermedad común en los perros jóvenes de aproximadamente 4 años, por lo que se ha asociado a un mal manejo terapéutico de la infección parasitaria. Diferentes síntomas clínicos son observados como diarrea crónica, pérdida de peso, eosinofílica intermitente o persistente y aumento sérico de concentraciones de globulina (James & Donald, 2007).

La Nefritis granulomatosa es una enfermedad túbulo intersticial que a menudo va acompañada de enfermedades sistémicas crónicas que se caracterizan por múltiples granulomas en diversos órganos, y también es causada por *T. canis* que

induce granulomas pequeños y grises de 2 a 3 mm dispersos a través de la corteza renal (Fig. 3A). Estas lesiones probablemente son debidas a la respuesta de las células inmunes por la migración larvaria; estas células son macrófagos, linfocitos y eosinófilos rodeados por fibroblastos dentro de tejido conectivo (Fig.3B) donde normalmente el nemátodo se encuentra en el centro de esta lesión. Para su eliminación, la larva es fragmentada y después fagocitada siendo menos común que sea retenida. La lesión cicatriza por fibrosis, dejando un foco pequeño en la superficie capsular (James & Donald, 2007).



**Figura. 3- Nefritis granulomatosa, riñón, corteza.** A) Múltiples granulomas causados por la migración de la larva. B) un granuloma maduro compuesto de una larva de *Ascaroideo* rodeado de macrófagos y tejido conectivo fibroso y células inflamatorias. Tinción H&E. (A, B, and Inset, Courtesy Dr. W. Crowell, College of Veterinary Medicine, The University of Georgia; and Noah's Arkive, College of Veterinary Medicine, The University of Georgia.)



## 2.2. Criopreservación

La criopreservación de células, tejidos o hasta organismos completos por medio de la congelación a temperaturas de hasta bajo 0°C por ejemplo, -196°C, que es el punto de ebullición del nitrógeno líquido, es considerado el método de almacenaje más moderno (Elsen et al., 2007). El nitrógeno líquido es fácil de obtener, económico y esencialmente todos los procesos celulares vitales de los organismos son detenidos en este punto. El objetivo de la criopreservación es el mantenimiento de la viabilidad y actividad celular a temperaturas bajas. La criobiología se refiere a entender los efectos de las temperaturas bajas sobre los sistemas celulares, ya que el tiempo biológico es una consecuencia de determinadas reacciones bioquímicas y el frío prolonga el tiempo biológico puesto que hace más lentas estas reacciones bioquímicas. (Madero et al., 2006)

Las células vivas son estructuras muy complejas y dinámicas de sobrevivencia alta, pero la mayoría de las células también poseen capacidad de recuperación increíble en vista de los desafíos a los que se somete su supervivencia. Debido a esta resistencia, la ciencia de la criobiología, que es el estudio de la vida a temperaturas reducidas, es posible. Los criobiólogos han estado estudiando los límites de la vida a bajas temperaturas por lo menos desde 1663, cuando Henry Power informó la supervivencia de las anguilas vinagre congeladas por la exposición a una "entusiasta helada" al aire libre o en un baño de congelación de sal y hielo en el laboratorio. La literatura de la criobiología es muy amplia y abarca todo, desde la congelación de las células a la hipotermia humana.

Los fenómenos de criobiología se pueden considerar como el resultado de dos efectos contradictorios de la reducción de temperatura. El efecto más familiar de temperaturas reducidas es una reducción en la tasa de deterioro de los sistemas biológicos. Este es el efecto que nos permite recuperar los alimentos del congelador casa y disfrutar de ellos meses o años después de que se hubieran convertido en otra cosa comestible. Pero el otro efecto es de naturaleza

destruccion, y surge no sólo a causa de la transformacion del agua líquida en cristales de hielo, sino también porque los sistemas vivos optimizados para la supervivencia a temperaturas más altas no puede realizar el mantenimiento de funciones de auto aclimatarse a temperaturas más bajas y se pueden presentar fenómenos tales como los cambios de fase de los lípidos de membrana o la desnaturalización de las proteínas, para lo cual no se han desarrollado defensas específicas. (Wowk, 2010)

Los métodos de criopreservación logran preservar los sistemas vivos a temperaturas criogénicas cuando los efectos destructivos de baja temperatura pueden ser lo suficientemente limitadas durante el enfriamiento. El reto de la crio preservación es alcanzar con éxito temperaturas suficientemente bajas para evitar cualquier cambio adicional durante períodos de tiempo virtualmente ilimitados. (Wowk, 2010).

La temperatura es una medida de la energía interna en un sistema físico. Es esta energía interna la que permite el movimiento de las moléculas, disociación y las reacciones químicas. A medida que la temperatura se reduce, hay menos energía y menos movimientos moleculares. En muchos sistemas, tales como el agua pura, la reducción de temperatura por debajo de un cierto punto resulta en una reorganización que conlleva a la formación de cristales; esto se conoce como congelación. En otros sistemas, esto no sucede. En su lugar, la reducción de temperatura simplemente provoca más y más lentitud de los movimientos moleculares. A esta temperatura, la "temperatura de transición vítrea," el sistema casi completamente pierde su fluidez y se convierte en un "sólido, líquido", que es conocido más formalmente como "cristal" y se dice que han "vitrificado". (Wowk, 2010)

Aunque el agua pura se congela y normalmente sólo puede ser vitrificada en condiciones extremas, mezclas de agua y altas concentraciones de muchas sustancias químicas solubles en agua puede llegar a vitrificarse. Los productos

químicos que pueden permitir al agua vitrificarse incluyen la mayoría de los agentes llamados crioprotectores (CPAs) que los criobiólogos han usado para proteger las células del daño de congelación y descongelación. Cuando una célula se somete a una permeabilidad específica por crioprotectores en concentraciones suficientemente altas permiten la vitrificación, y así, todos los componentes moleculares de las células se quedan encerrados en el espacio vitrio que se forma y por lo tanto se vuelven incapaces de cambiar con el tiempo. (Wowk, 2010)

La vitrificación previene el daño relacionado con la formación de hielo, que incluye la ruptura mecánica de las estructuras extracelulares en tejidos organizados y órganos, deshidratación osmótica celular y la contracción durante la congelación lenta, formación de hielo intracelular y la destructiva cristalización intracelular de hielo durante la congelación rápida y durante la descongelación y la exposición a elevadas concentraciones de solutos intracelulares y extracelulares que pueden producir efectos nocivos o precipitar después de exceder sus límites de solubilidad. (Wowk, 2010)

Sin embargo, no todos los daños se pueden evitar gracias a la vitrificación, También existe daño causado por exposición a bajas temperaturas, que se le llama lesión por la refrigeración. La naturaleza de esta lesión no se entiende, pero puede estar relacionado con las transiciones de lípidos a esta fase, la desnaturalización de proteínas u otros fenómenos. Curiosamente, el daño por frío no ocurre a muchos de los complejos vivos, pero sí por ejemplo a los riñones de mamíferos.

Pero para poder considerar el uso de la criopreservación, es importante conocer algunas de las variables que pueden afectar el proceso como la permeabilidad celular, volumen osmóticamente inactivo y la relación superficie con el área de la célula, todo esto depende y varía según la especie celular y el estadio en el cual está al momento de ser sometida al proceso de criopreservación.

### **2.2.1 Transporte a través de las membranas durante la congelación y descongelación**

Las bajas temperaturas que son asociadas al aumento de la rigidez de la membrana, y la rapidez con la que suceden los cambios osmóticos en los procesos de congelación y descongelación hacen muy difícil el movimiento de moléculas a través de la membrana mediante procesos de transporte activo, el cual se sabe que son dependientes de ATP, la disminución de temperatura desde 25°C a 10°C reduce en un 60% la actividad de las bombas dependientes de ATP y la difusión facilitada o como transporte concomitante de dos moléculas a través de la membrana dependiente una de ellas de ATP y/o iones H<sup>+</sup>, en consecuencia, los procesos de difusión y ósmosis son los que predominan en los momentos de estrés osmótico. (Mendoza, Duplin, & Warren, 2000)

La difusión es un proceso mediante el cual las moléculas de una sustancia tienden a alcanzar una distribución homogénea en todo el espacio al cual les es posible acceder. La magnitud de la tendencia a difundir desde una zona a otra si está presente una membrana que separe las dos zonas está definida por la ley de difusión de Fick, que relaciona el gradiente entre las dos zonas (gradiente químico o de concentración) y las características de la membrana (grosor, área de sección transversa y permeabilidad para un determinado soluto), siendo directamente proporcional a la superficie (área) de la membrana y a la diferencia de concentración del soluto entre los dos lados e inversamente proporcional al espesor (grosor) de la membrana. La velocidad de la difusión es proporcional a una constante de difusión que depende de las propiedades de la membrana y de cada soluto en particular, un equilibrio puede conseguirse en segundos si la distancia es de micras, pero puede subir a varias horas si la distancia de difusión se incrementa a milímetros. (Mathews, van Holde, & Ahren, 2003)

La presión osmótica se suele expresar en osmoles y depende exclusivamente del número de partículas disueltas (moles) por unidad de volumen, con independencia

de su carga eléctrica, peso o fórmula química, los productos criopreservados se deben almacenar a temperaturas desde  $-133^{\circ}\text{C}$  (vapores de nitrógeno líquido) a  $-196^{\circ}\text{C}$  (nitrógeno líquido). A estas temperaturas no existen fenómenos de difusión ni energía térmica suficiente para llevar a cabo las reacciones químicas y por tanto las dificultades de la congelación no derivan de la permanencia a temperaturas bajas sino de los procesos de congelación y descongelación. (Loken & Demetrik, 2005)

### **2.2.2 Métodos de criopreservación**

Podemos clasificarlos de acuerdo a la velocidad de congelamiento y descongelamiento en protocolos de congelación lenta - descongelación lenta, congelación lenta - descongelación rápida, en las cuales la adición de crioprotectores suele hacerse por pasos y el descenso de la temperatura se realiza lentamente en un congelador programable. La descongelación rápida se hace rápidamente a temperatura ambiente o en un baño de agua a  $30^{\circ}\text{C}$  para evitar que se vuelva a cristalizar. (Madero et al., 2006)

La congelación ultrarrápida fue originalmente descrita para la congelación de embriones, por Trouson en 1986. Implica la rápida deshidratación celular, utilizando altas concentraciones de crioprotector, usualmente DMSO y sacarosa, seguida de inmersión en nitrógeno líquido. La vitrificación tampoco requiere la utilización de un congelador programable; se basa en la congelación rápida en una mezcla de altas concentraciones de crioprotectores, que a bajas temperaturas aumentan su viscosidad formando un sólido amorfo, sin formación de hielo. (Boiso, 2001)

### **2.2.3 Agentes crioprotectores (CPA)**

Los criopreservantes son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada, que es el punto en el cual una composición dada de A y B solidifica como un elemento puro, el descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometido será menor. (Madero et al., 2006)

Bioquímicamente es posible distinguir tres tipos de crioprotectores:

Los alcoholes: Metanol, etanol, propanol, 1-2 propanediol y glicerol

Azúcares: glucosa, lactosa, sucrosa, sacarosa; y el

Dimetil sulfóxido (DMSO)

Los crioprotectores pueden clasificarse también en agentes penetrantes y no penetrantes de acuerdo a la permeabilidad celular:

#### **2.2.3.1 Los crioprotectores penetrantes**

Son de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana celular. Se utilizan: el glicerol, el dimetilsulfoxido (DMSO) y propanediol (PROH). El dimetil sulfóxido es un solvente bipolar aprótico, hidrosoluble, de bajo peso molecular; desde el descubrimiento de sus propiedades crioprotectoras por Lovelock en 1959, el DMSO se ha usado como un crioprotector. Su acción crioprotectora se atribuye principalmente a su habilidad de prevenir acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento, y la formación de cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana, su bajo peso molecular permite la entrada rápida través de la membrana celular, modula la

estabilidad y fases de la bicapa de los fosfolípidos, así como también afecta los procesos de solvatación de agua. Se han sugerido las interacciones electrostáticas de DMSO con fosfolípidos lo cual parece ser crítico para la crioprotección de la membrana. (Madero et al., 2006)

El 1-2 propanediol ha sido utilizado principalmente para congelación de blastocistos y embriones en estado de preimplantación de humanos y otras especies. El propanediol tiene una toxicidad más baja a altas concentraciones que el glicerol o el DMSO. La adición de algunos azúcares mono, di o tri sacáridos no entran a la célula, pero estos actúan como crioprotectores encargados de incrementar la presión osmótica del medio externo de la célula. Durante los procesos de descongelación, esta propiedad osmótica de los compuestos no permeables puede también ser usada para limitar la entrada de agua durante el procedimiento de remoción del crioprotector, protegiendo por tanto al embrión de la excesiva y rápida rehidratación.

El uso del glicerol como agente crioprotector ha sido uno de los favoritos por muchos investigadores tanto para el uso en embriones y células reproductoras de los seres vivos como en bovino, equinos, y hasta en humanos. Pero también ha tenido uso en la vitrificación de larvas de parásitos de plantas y animales. Varias publicaciones han catalogado los diferentes resultados que el uso de este químico ha tenido y cuales han dado los mejores resultados. Aun considerando que la vitrificación es un método lento, éste conduce a una sobresaliente mejoría en los niveles de supervivencia y también proporciona un mejor control del almacenaje de material biológico almacenado. Por lo tanto la criopreservación de varios protozoarios, helmintos y parásitos así como plantas e insectos se sigue estudiando con el fin de que brinden un impulso para más experimentación. El glicerol se requiere generalmente para proteger a las células de una lesión por los efectos de concentración de solutos extracelulares o bien lesiones físicas que causen deformaciones por la diferencia osmótica intracelular.

### **2.2.3.2 Agentes crioprotectores no-penetrantes**

Son sustancias de alto peso molecular, efectivas a altas velocidades de congelación, son importantes por ejercer su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes. Los más utilizados son: sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano. Estos compuestos generalmente son polímeros que forman puentes hidrógeno con el agua, reduciendo la actividad del agua a una magnitud mucho mayor que la que se predeciría por su concentración molar.

La adición del criopreservante, genera estrés osmótico sobre las células porque aumenta la osmolaridad del medio. Las células inicialmente se deshidratan para compensar la fuerza osmótica inducida por la presencia de los CPA y después se hidrata. La definición de los parámetros biofísicos de cada célula y el estudio de la interacción con los agentes crioprotectores durante la congelación y descongelación de las células deben ser definidos para establecer los límites físicos que aseguren la supervivencia de la célula.



### **3. Materiales y Métodos**

#### **3.1 Obtención de adultos de *Toxocara canis***

Se realizó la colección de adultos de *Toxocara Canis* directamente de intestino delgado de cachorros que se encontraban en el antirrábico del municipio de Guadalupe, Nuevo León. Se realizaron diferentes búsquedas de adultos por el transcurso de un año.

Se decidió realizar la búsqueda de adultos del parásito en cachorros, ya que cuando los caninos de edad avanza consumen los huevos embrionados de *Toxocara canis*, la mayoría migra hacia tejidos somáticos, llevando a su mayor propagación hacia músculos, a riñón, hígado, o sistema nervioso central.

Se analizaron un total de 10 cachorros con una edad aproximada de 2 a 5 meses, criollos y de diferentes razas, con un estado de nutrición de 4-5. Los cachorros mostraban una infestación de pulgas. El método de eutanasia fue por medio de dosis alta de pentobarbital sódico vía intramuscular.

Después del proceso de eutanasia, se procedió a hacer una incisión en el área del abdomen por medio de la línea alba, esto con el fin de únicamente obtener el intestino delgado del animal. Se diseccionó el intestino delgado completo horizontalmente en busca de adultos de *Toxocara canis*.

Estos adultos de *Toxocara canis* fueron transportados al laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, en un recipiente de plástico con cierre hermético, con suero salino fisiológico a temperatura ambiente. El protocolo de investigación fue revisado y aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León y está regido bajo la norma: NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

### **3.2 Extracción de huevos y conteo por la Técnica de Mc Máster**

Los parásitos adultos fueron lavados con solución salina fisiológica, y se mantuvieron en cajas de Petri humedecidas en solución salina fisiológica junto con un antibiótico (Gentamicina 1:50 ml); se examinaron los parásitos adultos para diferenciar hembras de machos, bajo estereoscopio Stemi 200-C (Carl-Zeiss C.P. 73447 Oberkochen, Alemania).

Después de la extracción de huevos, éstos fueron contabilizados mediante la técnica de Mc Master bajo el siguiente protocolo:

1. Se tomó un total de 0.4 ml de solución salina fisiológica que contenía huevos de *Toxocara canis*.
2. La solución se vertió dentro de las placas de vidrio de la cámara de Mc Master.
3. Se contabilizó el total de huevos en cada uno de los tres segmentos de la cámara, que son separados por 8 líneas que sirven de referencia.
4. Se analizó el total de huevos en 0.4 ml de solución.

### **3.3. Estandarización de técnica de maduración de huevos de *Toxocara canis***

Se probaron tres diferentes medios de cultivo para la maduración de los huevos:

- A) Solución salina y gentamicina a concentración 1:10.
- B) Medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco by Life Technologies ) al 10% y antibiótico antifungico (ATM: 10.000 unidades/ml de penicilina, 10 mg de estreptomycin, 25µg/ml de anfotericina B (Gibco by Life Technologies)
- C) Solución de hidróxido de sodio al 10%

Los tres medios de cultivo fueron evaluados mediante el desarrollo de los huevos que mostraban la larva en movimiento. Cada caja de cultivo celular contenía aproximadamente  $1000 \pm 100$  huevos y se incubaron a 24 °C con una humedad relativa del 80%.

### 3.4 Criopreservación

El conteo de huevos se realizó mediante la técnica de McMaster para lograr obtener un total de  $1000 \pm 500$  huevos los cuales fueron trasladados a criotubos (Nalgene®), los cuales contenían solución RPMI 1640 (Gibco by Life Technologies) y los crioprotectores.

Para definir los tratamientos óptimos para la técnica de criopreservación de los huevos, se realizaron un total de 12 tratamientos (grupos de tres repeticiones) con diferentes concentraciones de glicerol y DMSO, los cuales se muestran en la Tabla 1.

		GLICEROL		
		0%	5%	10%
D O M S O	0%	0	0/5	0/10
	5%	0/5	5/5	5/10
	10%	0/10	10/5	10/10
	20%	0/20	20/5	20/10

**Tabla 1.- Concentraciones de crioprotectores.** Las combinaciones se realizaron en base a la mayor y menor concentración reportada en la literatura

Las cantidades finales de soluciones que llevaba el criotubo son: 1  $\mu$ l de solución, conteniendo una combinación del crioprotector, medio de cultivo RPMI, y 100  $\mu$ l de solución salina que contenían  $1000 \pm 100$  huevos, entre los cuales podrían haber huevos embrionados y huevos no desarrollados. (Tabla 2)

Tratamiento	RPMI	DMSO	Glicerol
1	900 µl	0	0
2	850 µl	0	50 µl
3	800 µl	0	100 µl
4	850 µl	50 µl	0
5	800 µl	50 µl	50 µl
6	750 µl	50 µl	100 µl
7	800 µl	100 µl	0
8	750 µl	100 µl	50 µl
9	700 µl	100 µl	100 µl
10	700 µl	200 µl	0
11	650 µl	200 µl	50 µl
12	600 µl	200 µl	100 µl

**Tabla 2.-** Cantidad de soluciones mezcladas en cada microtubo, dando un total de 1000 µl considerando los 100 µl de solución salina con huevos del parásito.

Un total de 2 grupos con 5 repeticiones fueron criopreservados para la infección experimental que contenían un total de  $2500 \pm 500$  huevos larvados de *Toxocara canis* y el estudio de viabilidad, los cuales fueron sometidos a congelación con dos crioprotectores glicerol al 10% y dimetil sulfóxido al 5% y RPMI 1640, siguiendo el siguiente protocolo de congelación a cuatro tiempos: Fase de pre-congelamiento. +22°C a +2°C por 30 minutos, congelación a -28°C por 30 minutos, congelación a -80°C por 30 minutos, a nitrógeno líquido a -196°C. Los huevos fueron criopreservados durante 24 horas. Para la etapa de descongelación, se utilizó baño maría a 37°C durante un minuto hasta que solo un pequeño pedazo de hielo quedara en el criotubo.

### **3.5 Análisis de la viabilidad celular por Azul Tripán**

Para la recuperación y lavado de los huevos congelados, la solución de cada criotubo fue transferida a tubos de 2 ml y centrifugada por 1 min a 3000 revoluciones, se extrajo el excedente de líquido que contenía crioprotector, RPMI y huevos de *T. canis*. Se recuperó el pellet de huevos del fondo del tubo con micropipeta y se pasaron a tubos de 1.5 ml a los cuales se le agregó 100 µl de azul de tripán al 0.4% (Gibco by Life Technologies) para la evaluación de la viabilidad de los huevos descongelados considerando la integridad de la membrana.

### **3.6 Ensayo de viabilidad celular con MTT**

Se agregaron 25 mg de MTT en 5 ml de agua estéril, después se le agregaron 20 µl de solución MTT al tubo que contenía los huevos descongelados para medir la cantidad de sales de formazán producidas por la actividad mitocondrial (Heredero-Bermejo et al., 2013; Wadhawan, Singh, & Rathaur, 2014). Se dejó incubar durante 2 horas a 27°C para detectar un cambio en la coloración.

### **3.7 Modelo de infección experimental**

Se estandarizó la técnica de infección experimental con huevos larvados de *Toxocara canis* utilizando 10 ratones hembras de la cepa BALB/c (Ollero, Fenoy, Cuéllar, Guillén, & del Aguila, 2008) los cuales fueron infectados vía oral mediante una sonda esofágica con  $2500 \pm 500$  huevos larvados de *Toxocara canis* que no fueron congelados, esto para tener una referencia de la migración larvaria que realiza la larva. Después se realizó la infección experimental en 15 ratones hembras de la cepa BALB/C separados en tres grupos, 5 ratones infectados con huevos criopreservados con glicerol al 10%, otro grupo con 5 ratones infectados con huevos criopreservados con DMSO al 5 % y un grupo control de 5 ratones infectados con huevos sin criopreservar. Los ratones se mantuvieron en el Centro de Investigación y desarrollo en Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Nuevo León en racks y cajas (Sealsafe Next IVC Blue Line Tecniplast ®) a condiciones de temperatura de 28°C con agua y alimento *ad libitum* Estos ratones fueron eutanasiados a las 4 semanas de la infección experimental (E. Pinelli et al., 2005).

### **3.8. Técnica de Trichinoscopía**

Después de la eutanasia se tomaron muestras de hígado, riñón, pulmón, musculo, cerebro y ojo para la técnica de impronta.

Se tomó una muestra (0.1 gramos) de cada uno de los órganos y de manera independiente fueron colocados entre dos piezas de vidrio (compresor de tejidos para triquinoscopía). Las muestras así preparadas fueron observadas al microscopio invertido en el objetivo de 5x, la morfología en casos de duda fue establecida con objetivos de mayor magnificación.

### 3.9 Extracción de ADN y detección de *T.canis* por PCR

Se utilizó para la extracción de DNA el kit Wizard Genomics DNA Purification Kit (Promega, MA, Estados Unidos), para contar con un control positivo, se utilizaron muestras de parásitos adultos encontrados en intestino delgado. Estas muestras fueron trabajadas bajo condiciones de bioseguridad en la campana de flujo laminar 1300 Series A2 (ThermoScientific®, Waltham, MA, 02454), se maceró la muestra en un mortero y se le agregó la solución para lisis, la muestra se transfirió a un microtubo que se colocó en la centrifuga refrigerada Hermele Z 300 k a 1300 revoluciones por un minuto, después se descartó el sobrenadante. Se le agregó 900 µl de solución G1, se mezcló y se dejó reposar durante un minuto, se le agregaron 300 µl de solución G2 y se sometió la muestra a 61°C durante 15 minutos. Pasado el tiempo especificado, se agregaron 100 µl de la solución G3, se mezcló durante 15 segundos, y después se centrifugó a 1300 revoluciones por 3 minutos, se removió el sobrenadante y se pasó la solución a un tubo limpio de 2.0 ml al cual se le agregó 300 µl de isopropanol al 100%, se invirtió 15 veces y se dejó reposar durante 3 minutos, se centrifugó a 1300 revoluciones por 1 minuto, se vació el sobrenadante y se dejó sobre una toalla de papel para poder recuperar la muestra de DNA al cual se le agregó 300 µl de etanol al 70%, se centrifugó a 1300 revoluciones por 30 segundos, se desechó el sobrenadante sin manipular el pellet, y se le agregaron 100 µl de solución G4, se sometió a una temperatura de 64°C en agua para que el pellet quedara suspendido durante 30 a 40 minutos.

El ADN obtenido se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizó bajo la luz UV del transiluminador (Benchop UV Transilluminator, Upland, CA USA).

Se realizó una amplificación de la secuencia ITS-2 de *Toxocara canis* utilizando los iniciadores F, YY1 (CGGTGAGCTATGCTGGTGTG) y R NC2 (TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT) (Li et al., 2007). Las reacciones de PCR fueron realizadas utilizando el kit Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, C.P.92008, Estados Unidos), el cual contiene 22 µ/mL de Taq DNA polymerase recombinant acomplejada con el anticuerpo Platinum® Taq, 22 mM Tris-HCl (pH 8.4), 55 mM KCl, 1.65 mM MgCl<sub>2</sub>, 220 µM

dGTP, 220  $\mu$ M dATP, 220  $\mu$ M dTTP, 220  $\mu$ M dCTP y estabilizadores. La reacción se llevó a cabo bajo condiciones estériles dentro de la campana UVP/UV2 Sterilizing PCR Cabinet, (Upland, C.A., Zip code 91786) siguiendo las condiciones establecidas por el fabricante en un volumen final de 50  $\mu$ l (21.5  $\mu$ l de Supermix, 1.5  $\mu$ l de ADN y 1  $\mu$ l de cada uno de los iniciadores (100  $\mu$ m/ $\mu$ l).

Se realizó un gradiente de temperaturas para estimar la temperatura óptima de alineamiento. El protocolo de amplificación utilizado fue el siguiente: 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos (94 °C por 30 segundos, 55°C 30 segundos, 72°C 1 minuto) y una extensión final de 72 °C durante 5 minutos (Li et al., 2007). Las de temperaturas de alineamiento para el gradiente programadas en el termociclador (Axygen Maxygene, CORNING, USA) fueron las siguientes: 50.0°; 51.5°, 52.7°, 55.9°, 59.4°, 62.9°, 64.4°, 67.5°, 70.3° y 72.6°.

Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% y visualizados bajo la luz UV del transiluminador (Benchop UV Transilluminator Upland, CA. USA).

Para las muestras de tejidos de los ratones se utilizó el protocolo anteriormente descrito para la extracción de ADN y se realizó el PCR utilizando la temperatura óptima de alineamiento obtenida en el gradiente, siguiendo las instrucciones arriba mencionadas.



## 4.Resultados

### 4.1 Obtención de huevos de *Toxocara canis*.

En la primera búsqueda se encontraron un total de 9 adultos de *Toxocara canis*. En cuanto a las lesiones se observaron hemorragias a lo largo del intestino. Además se encontraron otros parásitos como *Tenias* y *Ancylostomas*.

Se encontraron dos hembras, las cuales se sometieron a la extracción de huevos de parásito directamente del útero. Un Total de  $2000 \pm 1000$  huevos fueron colectados. Se confirmó su viabilidad y estructura bajo microscopio invertido Axiovert 40 C (Carl-Zeiss C.P. 73447 Berrochen, Alemania). (Figuras 4 y 5).



**Figura 4.** Adulto de *Toxocara canis* encontrado en intestino de cachorro.



**Figura 5.** Se muestra la extracción de huevos directamente de un hembra madura, dentro de una caja de petri con solución salina fisiológica. La extracción se hizo mediante la observación del adulto bajo estereoscopio.

## 4.2. Estandarización de métodos de cultivo para el desarrollo de huevos de *Toxocara canis*.

Los huevos cultivados con los diferentes medios de cultivos especificados en la sección de Material y Métodos. Fueron observados bajo microscopio invertido (Carl-Zeiss C.P. 73447 Oberkochen, Alemania) determinar la presencia de microorganismos contaminantes y evaluar el desarrollo de la larva (Tabla 3).

En la evaluación de contaminación, encontramos que en el tratamiento a) se presentó contaminación de hongos y bacterias desde el día 7, lo cual pudo provocar un lento desarrollo de los huevos a etapa embrionaria. En el tratamiento b) no ocurrió cambio alguno en los huevos debido a la concentración de antibiótico/antifúngico mientras que el tratamiento c) fue considerado el óptimo ya que se consiguió el desarrollo de los huevos a la etapa embrionada y no se observó contaminación. (Figura 6).

Tratamiento	7 días	14 días	21 días	Valores absolutos
	% Huevos larvados / Contaminación	% Huevos larvados /Contaminación	% Huevos larvados /Contaminación	
a) Gentamicina y solución salina	20% Contaminación	26% Contaminación	30% Contaminación	25.3%
b) RPMI y antibiótico/anti fúngico	0% Contaminación	0% Contaminación	0% Contaminación	0%
c) Hidróxido de sodio al 10%	60% Sin Contaminación	70% Sin Contaminación	80% Sin contaminación	70%

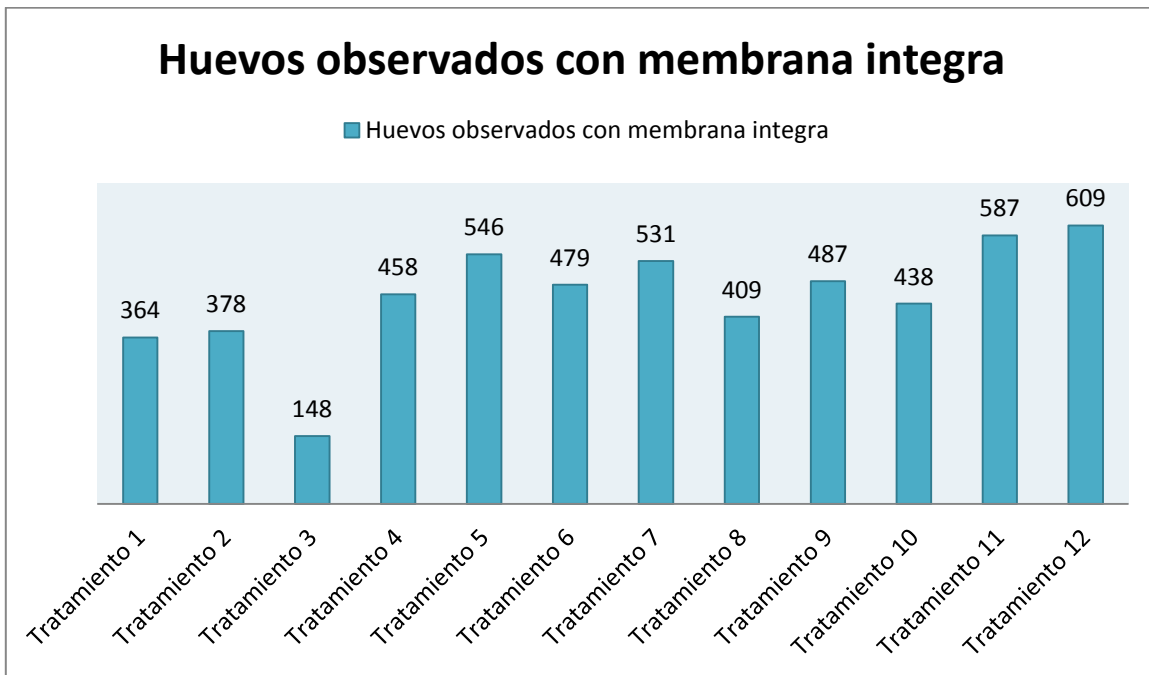
**Tabla 3. Evaluación de métodos de cultivo para el desarrollo de huevos de *Toxocara canis*.**  
Las cajas contenían  $1000 \pm 100$  huevos extraídos directamente de útero de una hembra adulta de *Toxocara canis*.



**Figura 6.** Huevos de *Toxocara canis* después de 2 semanas de incubación en hidróxido de sodio donde se observa su desarrollo a huevo larvado.

### 4.3. Criopreservación de huevos de *Toxocara canis* utilizando DMSO, Glicerol y combinación Glicerol/DMSO

Después de la congelación de los huevos con los 12 tratamientos evaluados, se analizó el movimiento de las larvas y la morfología del huevo. En ninguno de los tratamientos se observó movimiento de la larva a las 24, 48, y 72 horas después de la descongelación, por lo cual, los huevos descongelados fueron colocados en la cámara de Mc Master para evaluar su morfología e integridad de membrana, encontrándose que en todos los tratamientos, a pesar de no observar movimiento de la larva, se observaba integridad de la membrana, el tratamiento 3 (Glicerol 10%) contenía la menor cantidad de huevos (148) y en el tratamiento 12 (glicerol 10% y DMSO 20%) se observó la mayor cantidad de huevos (609) sin daño en la membrana. (Figura 7)



**Figura 7.** Evaluación de los 12 tratamientos para la congelación de huevos, considerando movimiento y morfología

#### 4.4. Evaluación de viabilidad con Azul de Tripano

Debido a que las larvas no mostraban movimiento en ninguno de los 12 tratamientos, se optó por seleccionar aquellos que contenían la menor cantidad de crioprotectores, Glicerol 10% y Dimetil sulfóxido 5%, conforme a lo reportado en la literatura revisada. (Ramp, Eckert, & Gottstein, 1987) para reducir la toxicidad y analizar si éstos permanecían viables.

Se evaluó la integridad de la membrana de los dos grupos tratamiento a los cuales, después de ser descongelados y lavados, se les agregó solución de azul de tripano (0.4%). Se observó que algunos huevos fueron teñidos internamente, lo cual muestra daño en la membrana y muerte, mientras que otros conservaron su membrana íntegra. Se realizó un conteo en cámara de Mc Master de la cantidad total de huevos observados, huevos teñidos, huevos larvados y no larvados. Los resultados se observan en la tabla 4, donde el tratamiento con DMSO 5% muestra el mayor porcentaje de viabilidad celular (71%) así como el mayor porcentaje de huevos larvados (57%) los cuales son los de interés para el presente estudio.

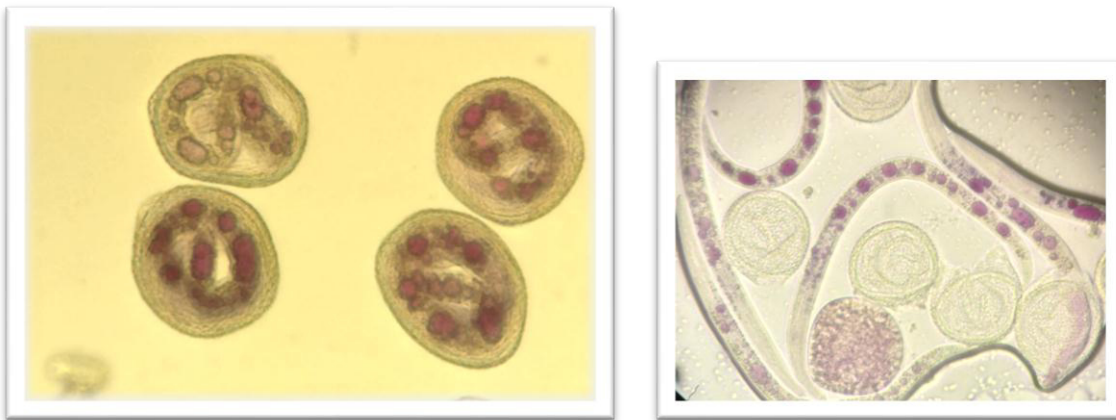
Tratamiento	Glicerol 10%	Valores absolutos	DMSO 5%	Valores absolutos
Huevos observados	346		468	
Huevos teñidos	169	49%	138	29%
Huevos Larvados	178	51%	268	57%
Huevos no larvados	154	45%	171	36.5%
Huevos vacíos	14	4%	29	6.5%

**Tabla 4.** Cantidad de huevos teñidos, larvados, no larvados y vacíos después de la criopreservación con la tinción de Azul de tripan. Los criotubos contenían un total de  $500 \pm 100$  huevos de *Toxocara canis*

#### 4.5. Ensayo de viabilidad celular con MTT

Para la evaluación de viabilidad y comprobación de actividad metabólica de la larva, se utilizó el ensayo con MTT, el cual es utilizado para análisis de viabilidad en cultivos celulares.

En ambos tratamientos hubo tinción de color púrpura en el ensayo con MTT, lo cual demuestra la reducción de sales y por ende actividad metabólica de la larva que se encuentra dentro del huevo (Figura 8).



**Figura 8.** Huevos descongelados de *Toxocara canis* evaluados con MTT que muestran actividad mitocondrial.

En la tabla 5 se observa que con ambos tratamientos existe alrededor del 50.6% de actividad metabólica de las larvas, el porcentaje mayor de actividad (58.7%) se presentó en el tratamiento con DMSO al 10%, además se observó la mayor cantidad de huevos larvados, lo cual concuerda con las observaciones del análisis con azul tripano.

Tratamiento	Glicerol 10%	Valores absolutos	DMSO 5%	Valores absolutos
Huevos observados	389		252	
Huevos teñidos	165	42.5%	148	58.7%
Huevos Larvados	180	46.3%	158	62.7%
Huevos no larvados	141	36.2%	83	33%
Huevos vacíos	68	17.5%	11	4.3%

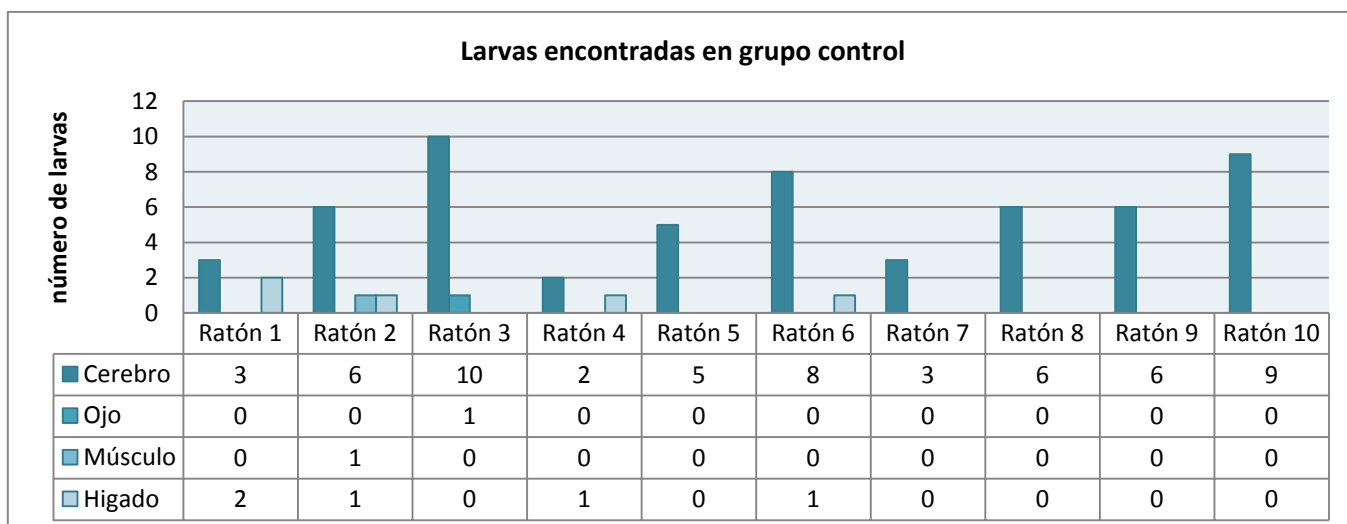
**Tabla 5.** Cantidad de huevos teñidos, larvados, no larvados y vacíos después de la criopreservación con la tinción de MTT. Los criotubos contenían un total de  $500 \pm 100$  huevos de *Toxocara canis*



#### 4.6. Análisis de la capacidad infectante y migratoria por la técnica de Trichinoscopia

Mediante la infección experimental en modelos biológicos se busca comprobar que los huevos que fueron congelados son viables y siguen manteniendo su capacidad de migrar hacia otros tejidos.

Como grupo control de migración de la larva, 10 ratones fueron infectados con huevos de *T. canis* que no fueron criopreservados, los resultados se muestran en la gráfica 9 en donde se puede observar que en el 100% de los ratones se presentó migración a cerebro, el 40% (4 ratones) presentó migración a hígado, el 10% (1 ratones) al ojo y el 10% (1 ratón) a músculo.



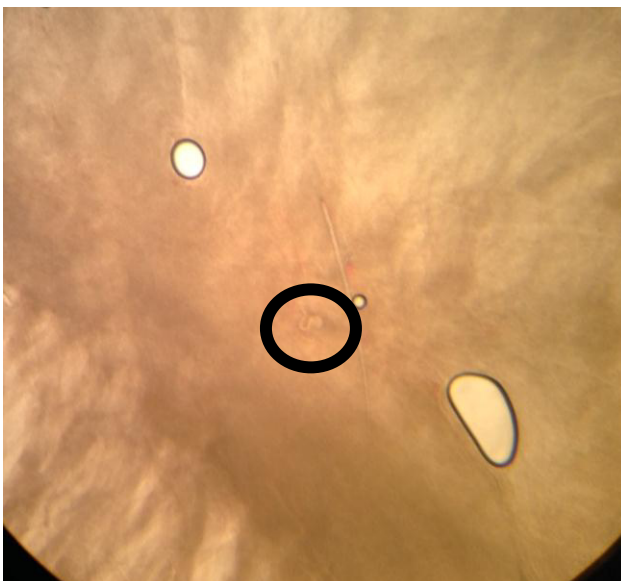
**Figura 9.** Numero de larvas encontradas en cerebro, ojo, músculo, e hígado de 10 ratones infectados experimentalmente con huevos larvados de *Toxocara canis*.

Después de realizar el modelo de infección experimental con los huevos previamente criopreservados, se realizó la necropsia y obtención de órganos (hígado, riñón, pulmón, musculo, cerebro y ojo) para su observación mediante la técnica con trichinoscopio.

Para comprobar que el parasito migró a los tejidos se realizó un registro de las larvas encontradas, en donde se observó que el cerebro fue el órgano con mayor cantidad de larvas tanto en el Grupo control (huevos sin criopreservar) como en los dos tratamientos de crio preservación (Glicerol al 10% y DMSO 5%), no encontrándose larvas en riñón, músculo ni ojo. Tabla 6 y Figura 10.

Órganos	Grupo Glicerol 10%	Grupo DMSO 5%	Grupo Control
Cerebro	7	6	12
Pulmón	2	1	3
Hígado	1	1	2

**Tabla 6.-** Número de larvas encontradas en 0.1 gr de órganos extraídos de los ratones infectados experimentalmente.

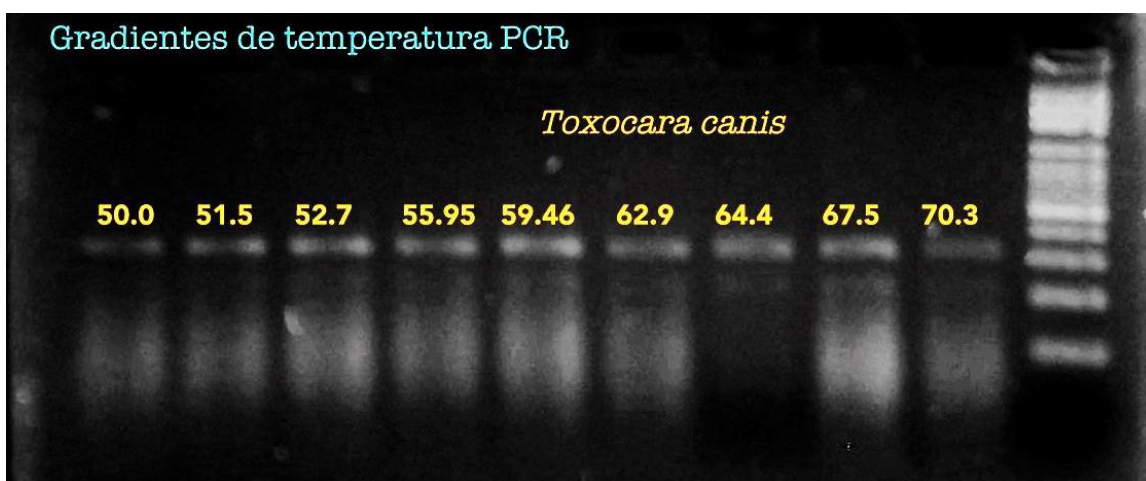


**Figura 10.** Cerebro de ratón infectado experimentalmente, en el cual se observa una larva de *Toxocara canis* que se desarrollo a partir de los huevos previamente criopreservados.

#### 4.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR para detección de *T.canis*

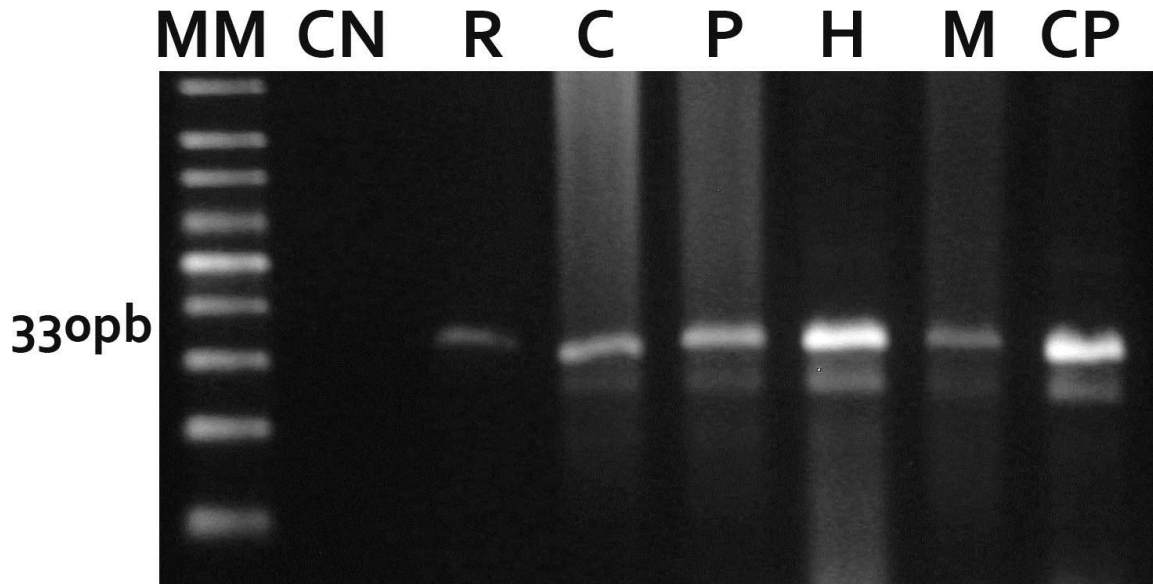
Existe la posibilidad de que en el tejido seleccionado para la técnica de Trichinoscopia no llegue a observarse una larva debido a la selección del tejido para desarrollar la técnica, sin embargo, esto no descarta la posibilidad de que si se haya presentado migración y existan larvas en otras secciones del órgano, para lo cual se procedió a analizar en los tejidos negativos por trichinoscopia la presencia de ADN de *T. canis* por PCR.

Para estandarizar el PCR, se realizó un gradiente de temperatura, utilizando como control positivo el DNA extraído directamente de una larva, como se puede observar en la Figura 11, se logró la amplificación esperada de una banda de 330pb del gen ITS-2 de *T.canis* en todas las temperaturas de alineamiento probadas, seleccionándose para las posteriores reacciones de amplificación la de 64°C.



**Figura 11.** Electroforesis de los productos amplificados por PCR en el gradiente de temperatura para *T. canis*.

Posteriormente se analizó la presencia de *T. canis* por PCR en las muestras de los tejidos recolectados de uno de los ratones infectados con huevos crio preservados con DMSO10%, observándose amplificación en las muestras de riñón, cerebro, pulmón, hígado y musculo (Figura 12), mostrando así que los huevos descongelados presentan actividad migratoria.



**Figura 12.** Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de amplificación del gen ITS-2 de *T.canis* (330 pb). MM. Marcador de peso molecular 100pb, CN: control negativo (agua), R: riñón C: cerebro, P: pulmón, H: hígado, M: musculo, CP: control positivo (DNA de la larva).

## 5. Discusión

En el ámbito veterinario es importante el estudio de los patógenos que se encuentran en nuestras mascotas sobre todo aquellos de importancia zoonótica, tal como lo es el parásito *Toxocara canis*, agente causal de la Toxocariosis humana, la cual es de gran importancia para la salud pública en diferentes países (P. A. M. Overgaauw & van Knapen, 2013).

Para la recolección de adultos de *Toxocara canis* se recomienda el uso de la piperazina, la cual paraliza, mas no mata al parásito, causando que éste sea arrojado por el perro de manera natural, sin embargo, en México el uso de la piperazina como desparasitante ha sido prohibido; ésta restricción, muestra la necesidad de contar con nuevas estrategias de recolección de muestras, en donde impere la bioética y bienestar animal.

El método de recolección de muestras de parásitos gastrointestinales a partir de intestino delgado es factible, pero no siempre se tienen resultados favorables, ya que existe la disyuntiva de que no se encuentre ningún parásito de ningún tipo, o simplemente no se encuentre la especie que se está buscando. Por eso es importante concentrarse en que sean cachorros, ya que se sabe que normalmente los perros adultos son infectados por los huevos que los cachorros expulsan por las heces, porque son ellos los que normalmente contiene el parásito adulto (Fahrion, Staebler, & Deplazes, 2008).

La característica de *larva migrans ocular* o visceral de el parasito en sus hospedadores paratenicos como roedores, aves y humanos se debe de considerar importante para la salud publica, y seguirse estudiando por que aun así los medicamentos que se encuentran actualmente disponibles, no son capaces de eliminar casi por completo las larvas de *Toxocara spp.* que se encuentran en tejido (Ivan & Carlos, 2011).

El uso de hidróxido de sodio al 1% resultó la mejor opción para la incubación de huevos de *Toxocara canis* que fueron extraídos directamente de la hembra. Se encontró que al incubarlos dentro de cajas de cultivo celular el tiempo de

desarrollo a etapa larvaria disminuye de dos semanas a 1 semana y media. Pero es importante conservar la temperatura a 24-27°C y suficiente humedad para un apto desarrollo a huevo larvado. El conteo con cámara de Mc Master nos dió un resultado de 3067 huevos en un 1ml de solución, entre larvados y no larvados.

Durante el transcurso de la infección, los ratones sufrieron alteraciones en su estado de ánimo y presentaron anorexia a partir de la tercera semana post infección, lo cual concuerda con lo reportado por Delgado y colaboradores en el 2009 (Delgado & Rodríguez-Morales, 2009), mostrando así que la sintomatología producida por los huevos criopreservados en el presente estudio concuerda con la que se presenta en una infección con la misma cantidad de huevos sin criopreservar.

No se han encontrado reportes en México o en otra parte del mundo de la crio preservación de huevos de parásitos, específicamente nemátodos, dando la pauta para establecer una técnica a partir de las utilizadas para la criopreservación de células y otros protozoarios.

## 6. Conclusiones

La congelación y almacenamiento en nitrógeno líquido de huevos de parásitos es una técnica factible que permite mantenerlos en un estado viable y disponibles para futuros experimentos.

En este estudio se demostró que con una técnica de congelación lenta y utilizando GLICEROL 10% y DMSO 5% como crioprotectores, los huevos en etapa larvaria del parásito *Toxocara canis* pueden ser preservados, manteniéndose una viabilidad hasta de un 71%, de tal forma, que se logró establecer un banco de ejemplares para estudios posteriores, donde al menos se probó su viabilidad por 24 hrs, sugiriendo que una prolongada criopreservación por meses o años puede ser posible.

Además los huevos larvados así criopreservados conservan su capacidad infectiva y de migración al ser evaluados en un modelo murino de infección.

El uso de técnicas moleculares para el diagnóstico de enfermedades en pequeñas especies como el PCR, representa una herramienta diagnóstica con alto potencial para ser utilizado en clínica y ofrecer un diagnóstico más rápido y certero.

## 7. Literatura citada

- Biologics, I. f. I. C. i. A. (2005). *Toxocarosis, Visceral Larva Migrans, Ocular Larva Migrans, Larval Granulomatosis, Toxocaral Retinitis*.
- Boiso, I. (2001). Criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*(4), 18.
- Delgado, O., & Rodríguez-Morales, A. J. (2009). Aspectos clínico-epidemiológicos de la toxocariasis: una enfermedad desatendida en Venezuela y América Latina. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 49, 1-33.
- Despommier, D. (2003). Toxocarosis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology, and Molecular Aspects. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 16, 265-272.
- Dunsmore, J. D., Thompson, R. C. A., & Bates, I. A. (1983). The accumulation of *Toxocara canis* larvae in the brains of mice. *International Journal for Parasitology*, 13(5), 517-521. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519\(83\)80017-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519(83)80017-4)
- Dzbenksi, T. H., Hautz, W., & Bitkowska, E. (2001). Experimental toxocarosis in rabbits: immunological markers of ocular infections. *Wiadomosci parazytologiczne*, 47(4), 591-596.
- Elsen, A., Ferrandis Vallterra, S., Van Wauwe, T., Thu Thuy, T. T., Swennen, R., De Waele, D., & Panis, B. (2007). Cryopreservation of *Radopholus similis*, a tropical plant-parasitic nematode. *Cryobiology*, 148-157.
- Fahrion, A. S., Staebler, S., & Deplazes, P. (2008). Patent *Toxocara canis* infections in previously exposed and in helminth-free dogs after infection with low numbers of embryonated eggs. *Veterinary Parasitology*, 152(1-2), 108-115. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.11.022>
- Hamilton, C. M., Brandes, S., Holland, C. V., & Pinelli, E. (2008). Cytokine expression in the brains of *Toxocara canis*-infected mice. *Parasite Immunol*, 30(3), 181-185. doi: 10.1111/j.1365-3024.2007.01002.x
- Herederó-Bermejo, I., Copa-Patino, J. L., Soliveri, J., Gomez, R., de la Mata, F. J., & Perez-Serrano, J. (2013). In vitro comparative assessment of different viability assays in *Acanthamoeba castellanii* and *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. *Parasitol Res*, 112(12), 4087-4095. doi: 10.1007/s00436-013-3599-5
- Ivan, M. F., & Carlos, C. J. (2011). Establecimiento de una línea celular primaria a partir de huevos con embrión de *Toxocara canis*. *Asociación Colombiana de Infectología*, 184-190.
- James, Z., & Donald, M. M. (2007). ***Pathologic basis of veterinary disease***. St. Louis, Missouri 63146.
- Li, M. W., Lin, R. Q., Chen, H. H., Sani, R. A., Song, H. Q., & Zhu, X. Q. (2007). PCR tools for the verification of the specific identity of ascaridoid nematodes from dogs and cats. *Molecular and Cellular Probes*, 21(5-6), 349-354. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2007.04.004>
- Loken, S., & Demetrik, D. (2005). A novel method for freezing and storing research tissue bank specimens. *Human Pathology*(36), 977-980.



- Madero, J. I., Lopez, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., Avila Portillo, L. M., . . . Reguero, M. T. (2006). Fundamentos de Criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 291 - 300.
- Magnaval, J. F., Glickman, L. T., Dorchie, P., & Morassin, B. (2001). Highlights of human toxocariasis. *Korean J Parasitol*, 39(1), 1-11.
- Mathews, K. M., van Holde, K. E., & Ahren, K. G. (2003). *Biochemistry*: Addison Wesley.
- Mendoza, J., Duplin, P., & Warren, T. (2000). The lower hydrolysis of ATP by the stress protein GroEL is a major factor responsible for the diminished chaperonin activity at low temperature. *Cryobiology*(41), 319-323.
- Nobuaki, A. (2006). Critical assessment of existing and novel model systems of toxocariasis *Toxocara: The Enigmatic Parasite*: CAB International.
- 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 Tropica*, 105(2), 124-130. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.11.001>
- Othman, A. A., Abdel-Aleem, G. A., Saied, E. M., Mayah, W. W., & Elatrash, A. M. (2010). Biochemical and immunopathological changes in experimental neurotoxocariasis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 172(1), 1-8. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.03.006>
- Overgaauw, P. A. (1997). Aspects of Toxocara epidemiology: toxocarosis in dogs and cats. *Crit Rev Microbiol*, 23(3), 233-251. doi: 10.3109/10408419709115138
- Overgaauw, P. A. M., & van Knapen, F. (2013). Veterinary and public health aspects of Toxocara spp. *Veterinary Parasitology*, 193(4), 398-403. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.035>
- Paola, P.-P. (2009). Ocular Toxocariasis.
- Pinelli, E., Brandes, S., Dormans, J., Fonville, M., Hamilton, C. M., & der Giessen, J. v. (2007). Toxocara canis: Effect of inoculum size on pulmonary pathology and cytokine expression in BALB/c mice. *Experimental Parasitology*, 115(1), 76-82. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2006.06.002>
- Pinelli, E., Withagen, C., Fonville, M., Verlaan, A., Dormans, J., van Loveren, H., . . . van der Giessen, J. (2005). Persistent airway hyper-responsiveness and inflammation in Toxocara canis-infected BALB/c mice. *Clin Exp Allergy*, 35(6), 826-832. doi: 10.1111/j.1365-2222.2005.02250.x
- Quiroz, H. (2005). *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos* (Vol. 1). México, DF: Limusa.
- Ramp, T., Eckert, J., & Gottstein, B. (1987). Cryopreservation and long-term in vitro maintenance of second-stage larvae of Toxocara canis. *Parasitol Res*, 73(2), 165-170.
- Salud, S. d. (2014). Se un dueño responsable. from [http://www.salud.df.gob.mx/ssdf/index.php?option=com\\_content&task=view&id=5457](http://www.salud.df.gob.mx/ssdf/index.php?option=com_content&task=view&id=5457)
- Schnieder, T., Laabs, E.-M., & Welz, C. (2011). Larval development of Toxocara canis in dogs. *Veterinary Parasitology*, 175(3-4), 193-206. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.027>

- Sommerfelt, I. E., Rosa, A., Duchene, A., Degregorio, O., López, C., Pisanú, A., & De Torres, R. (2004). *Toxocara canis* in experimentally infected pigs: migratory pattern and tissue lesions. *Veterinary Parasitology*, 125(3–4), 323-334. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.07.014>
- Strube, C., Heuer, L., & Janecek, E. (2013). *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. *Veterinary Parasitology*, 193(4), 375-389. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.033>
- Taira, K., Saeed, I., Permin, A., & Kapel, C. M. (2004). Zoonotic risk of *Toxocara canis* infection through consumption of pig or poultry viscera. *Vet Parasitol*, 121(1-2), 115-124. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.01.018
- Tomimura, T., Yokota, M., & Takiguchi, H. (1976). Experimental visceral larva migrans in monkeys. I. Clinical, hematological, biochemical and gross pathological observations on monkeys inoculated with embryonated eggs of the dog ascarid, *Toxocara canis*. *Nihon Juigaku Zasshi*, 38(6), 533-548.
- Wadhawan, M., Singh, N., & Rathaur, S. (2014). Inhibition of Cathepsin B by E-64 Induces Oxidative Stress and Apoptosis in Filarial Parasite. *PLoS ONE*, 9(3), e93161.
- Webster, G. A. A Report On *Toxocara Canis* Werner, 1782. *Can J Comp Med Vet Sci.*, 8(22), 272-274, 275-279.
- Wowk, B. (2010). Thermodynamic aspects of vitrification. *Cryobiology*, 60(1), 11-22. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.05.007>
- Zachary, J., & McGavin, M. D. (2011). *Pathologic basis of veterinary disease* (5th ed.).