



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



DISTRIBUCIÓN DE LARVAS DE DIFERENTES AISLADOS  
DE *Toxocara canis* EN ÓRGANOS Y LA RESPUESTA INMUNE  
HUMORAL ASOCIADA A UN MODELO MURINO.

**MARÍA ISABEL QUINTEROS PARRA**

Memoria para optar al título  
Profesional de Médico Veterinario  
Depto. de Medicina Preventiva Animal

PROFESOR GUIA: DR. FERNANDO FREDES MARTINEZ

Financiamiento: proyecto DID TNAC 24-02/01

**SANTIAGO-CHILE**

**2005**



# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



## DISTRIBUCIÓN DE LARVAS DE DIFERENTES AISLADOS DE *Toxocara canis* EN ÓRGANOS Y LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL ASOCIADA A UN MODELO MURINO.

### MARÍA ISABEL QUINTEROS PARRA

Memoria para optar al título  
Profesional de Médico Veterinario  
Depto. de Medicina Preventiva Animal

	CALIFICACIÓN	FIRMA
Profesor Guía: Dr. Fernando Fredes M.	.....	.....
Profesor Consejero: Dr. Héctor Alcaíno C.	.....	.....
Profesor Consejero: Dr. Carlos González R.	.....	.....

SANTIAGO, CHILE

2005

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quisiera agradecer a mi familia, especialmente a mis padres, pues su esfuerzo, apoyo incondicional y confianza en mí hicieron posible alcanzar el objetivo de terminar mi carrera.

Esta tesis fue posible gracias a la colaboración de varias personas, entre ellas Wilfredo Ibacache, quien fue mi apoyo desde los inicios de la carrera hasta el final donde trabajó activamente en el desarrollo de la fase experimental de esta tesis, gracias a lo cual fue posible realizar el trabajo en un tiempo menor de lo esperado. También agradecer al Dr. Luis Zuñiga por su entrenamiento en cuanto al manejo de ratones de laboratorio. Mis agradecimientos al Dr. Luis Ibarra por su buena disposición y apoyo en el planteamiento de los modelos estadísticos.

Finalmente, pero no por ello menos importante, quisiera agradecer a mi profesor guía, Dr. Fernando Fredes por su constante apoyo, comprensión y preocupación durante todo el desarrollo del trabajo hasta la culminación de éste.

## INDICE

RESUMEN	4
SUMMARY	5
INTRODUCCION	6
REVISION BIBLIOGRAFICA	8
OBJETIVOS	18
MATERIAL Y METODOS	19
RESULTADOS	25
DISCUSION	33
CONCLUSIONES	37
BIBLIOGRAFIA	38

## RESUMEN

Con el interés de aportar mayor información respecto de la toxocarosis humana, se realizó la infección experimental de ratones hembras BALB/c, de dos meses de edad con 1.000 huevos larvados de *Toxocara canis* provenientes de 3 zonas diferentes del país (norte, centro y sur). Para ello se utilizaron 36 ratones por cada zona, los cuales fueron infectados intraesofágicamente. Un tercio de estos se fueron eutanasiando a los 7, 14 y 30 días post infección. De cada ratón se obtuvo muestras de suero antes de la infección experimental, y luego semanalmente. De cada animal fueron extraídos separadamente el cerebro con los ojos, el hígado más el bazo, los pulmones, los riñones, el corazón, la musculatura de la cabeza y la carcasa (resto del tejido muscular). Los órganos se pesaron y se digirieron con pepsina. Posteriormente se realizó el recuento microscópico de larvas en cada uno de ellos. Este resultado fue expresado como larvas por gramo de tejido.

El mayor número de larvas fue recuperado de órganos de ratones infectados con larvas provenientes de la zona central del país y mayoritariamente de cerebro, carcasa y cabeza. A su vez la menor cantidad de larvas se obtuvo de ratones infectados con larvas provenientes de la zona sur del país, lo cual podría estar indicando la existencia de cepas con diferentes grados de patogenicidad. Sin embargo estadísticamente esta diferencia por zona sólo fue significativa en carcasa y cerebro entre las zonas centro y sur; y en riñón entre la zona centro con respecto a la sur y norte ( $p < 0,05$ ). En relación al tiempo de infección el único órgano en que se pudo observar una cinética de distribución fue en cerebro, ya que se encontró más larvas/gramo a los 30 días versus los 7 días post infección ( $p < 0,05$ ). Desde el punto de vista inmune humoral se identificó a 2 polipéptidos, ambos sólo Inmunoglobulina G reactivos, uno de ellos de alrededor de 14 kDa que fue reconocido específicamente por todos los sueros de los animales infectados y otro de alrededor de 35kDa, que fue reconocido en forma inespecífica.

A la vista de los resultados obtenidos fue posible concluir la existencia de cierta predilección de las larvas de todas las zonas del país por el cerebro, además de un mayor grado de migración del aislado de la zona centro versus el aislado de la zona sur.

## SUMMARY

Experimental infection of BALB/c female mice, with 1,000 larvated eggs of *Toxocara canis* from 3 different areas of the country (North, center and the south) was made. A third of these animals was eutanased at 7, 14 and 30 days post infection. From each mouse, serum samples were obtained before the experimental infection, and then on a weekly basis. From each animal brain, eyes, liver, spleen, lungs, kidneys, heart, head muscles and the carcass, were extracted. The organs were digested and later a microscopic count of larvae was carried out for each one of them.

The major number of larvae was recovered from organs of mice infected with larvae of the central zone of the country, mostly of brain, carcass and head. The minor amount of larvae was obtained from mice infected with larvae from the South zone of the country. This could be related to the existence of stocks with different degrees of pathogenicity. Statistically this zone difference was only significant for carcass and brains when comparing central and southern zones; and for kidney when the central zone was compared with the south and north ( $p < 0,05$ ).

In relation to the time of infection the only organ in which a kinetic of distribution could be observed was the brain, since there was more larvae/grams at day 30 in comparison to day 7 post infection ( $p < 0,05$ ).

From the humoral immune point of view, 2 polypeptides were identified one of them of around 14 kDa that was specifically recognized by all serums of the infected animals and another one of around 35kDa, that was recognized in unspecific form.

**KEY WORDS** : Toxocarosis, *Toxocara canis*, migración, respuesta inmune.

## INTRODUCCION

La toxocarosis es una enfermedad provocada por un parásito del perro llamado *Toxocara canis*, el cual es un Helminto de la clase Nematoda. Esta enfermedad en el hombre tiene una amplia distribución mundial con seroprevalencias en algunos países de 25% (California, EEUU) (Atias, 1999) y en casos extremos alcanzando niveles de hasta un 95% (Santa Lucia y La Reunión) (Magnaival *et al.*, 1994)

Los vermes adultos de *T. canis* normalmente se alojan en el intestino delgado del perro. Aquí se reproducen y sus huevos son eliminados al medio ambiente por las heces. Una vez en el ambiente, los huevos maduran hasta llegar al estado infectante, y es aquí donde el hombre puede ser infectado.

En el hombre, la enfermedad que causa este parásito se denomina toxocarosis y se produce cuando ingiere una determinada cantidad de huevos larvados desde el ambiente. Estos al llegar al sistema digestivo liberan una larva infectante que es capaz de atravesar la mucosa y migrar sistémicamente por el organismo alcanzando distintos órganos, en los cuales genera una respuesta inflamatoria que termina por dañar el propio tejido del hospedero. De esta forma, se producen diferentes cuadros clínicos cuya sintomatología central estará determinada por el lugar donde se alojaron finalmente las larvas. Así, en pacientes humanos se observa la toxocarosis ocular, cerebral, hepática, pulmonar o cardíaca. A estos distintos cuadros clínicos causados por el parásito se les denominan en general, síndrome larva migrans visceral (Atias, 1999).

Estudios serológicos realizados en nuestro país hace algunos años señalan que un 8,8% de la población estaría infectada con *T. canis*. De ellos un alto porcentaje son niños, pues son ellos los que carecen de los hábitos de higiene necesarios para disminuir el riesgo de infección, por lo cual ciertamente tienen mayores probabilidades de ingerir algún huevo larvado (Atias, 1999)

En la actualidad, existen pocos trabajos científicos que aporten información sobre el comportamiento de esta larva una vez que ingresa al individuo, y no existen estudios que intenten demostrar si existe relación entre el tipo de larva infectante y el tejido al cual migrará finalmente. Solo hay antecedentes en modelos animales que sugieren que la carga parasitaria o la respuesta inmune podrían determinar el destino final de las larvas infectantes.

Esta memoria de título pretendió aportar mayor información respecto de la toxocarosis humana a través de la infección experimental de ratones con larvas de *T. canis* provenientes de diferentes zonas del país, con el fin de determinar si existían diferencias en la migración visceral de larvas en el modelo murino que podrían estar asociadas a las diferentes características biológicas y genéticas de los parásitos.

## REVISION BIBLIOGRAFICA

### 1- Generalidades:

Taxonómicamente *T. canis* se ubica en el Phylum Nematelminthes, Clase Nematoda, Súper familia Ascaridoidea. Su hospedador es el perro, se localiza en el intestino delgado y su distribución es mundial (Urquhart *et al.*, 2001). *T. canis* es el parásito más común en el perro y todos los cachorros nacen al menos con unos pocos. En general, los ascáridos adultos infectan una restringida gama de hospedadores como son los cánidos, mientras que sus larvas son capaces de invadir, migrar y en muchos casos, mantenerse vivas e infectantes en una amplia variedad de hospedadores. Esta capacidad de tener diversos hospedadores paraténicos, convierte a *T. canis* en una seria amenaza para la salud humana (Georgi y Georgi, 1994)

### 2- Morfología:

Son nematodos relativamente grandes, de color blanquecino cuya cutícula posee finas estriaciones transversales. Tienen tres labios, dos alas cervicales laterales que miden 2.5 x 0.2 mm y tienen forma de punta de lanza; característica que los diferencia de *Toxascaris leonina*. El extremo posterior es romo en las hembras y digitiforme en los machos con dos espículas bien desarrolladas. Los machos de *T. canis* miden 4-10 cm x 2-3 mm de diámetro y las hembras de 5-18 cm. Los huevos son esféricos de 75-90  $\mu\text{m}$  y poseen una cubierta gruesa y rugosa con varias capas concéntricas. Son de color oscuro, no segmentados y su contenido ocupa prácticamente todo el espacio interior (Cordero y Rojo, 1999).

### 3- Ciclo biológico:

El ciclo biológico del parásito se inicia cuando las hembras de *T. canis*, una vez fecundadas, depositan sus huevos en el intestino delgado del perro que luego salen con las heces. Estos huevos están constituidos por una sola célula, son extraordinariamente resistentes a las inclemencias ambientales y pueden mantenerse infectantes en el suelo durante muchos años. Las condiciones medioambientales, especialmente la humedad, temperatura y tensión de oxígeno, influyen en el desarrollo de larvas infectantes que puede demorar 2-5 semanas. A 26-30 °C, e inmersos en el agua, el desarrollo del huevo tiene lugar en 9-18 días. La fase infectante es larva

II (L-II), que permanece dentro del huevo, después de la primera muda, hasta su ingestión por un hospedador (Cordero y Rojo, 1999).

La liberación de las L-II se produce en el perro, pero los estímulos adecuados para la eclosión se encuentran en una amplia gama de hospedadores, incluido el hombre. Esta aparente falta de precisión en el reconocimiento del hospedador se convierte en una sorprendente estrategia para los parásitos, ya que las larvas penetran en los tejidos de un hospedero paraténico, se encapsulan y son capaces de permanecer infectantes allí quizás durante toda la vida del hospedador, lo cual les permite perpetuar su especie (Georgi y Georgi, 1994).

El ciclo de *T. canis* es complejo, con cuatro posibilidades de infección: directa, mediante la ingestión de huevos larvados; placentaria o prenatal; galactogénica o transmamaria por la leche materna y a través de los hospedadores paraténicos.

Cuando una larva infectante de *T. canis* eclosiona de un huevo, penetra en la mucosa del intestino delgado. Las larvas llegan en primer lugar al hígado, a través del sistema porta en uno o dos días. Algunas permanecen en el hígado rodeadas por reacciones tisulares indefinidamente y otras migran rápidamente hasta los pulmones a través de la cava posterior, al lado derecho del corazón y a la arteria pulmonar. Una vez en los pulmones, las larvas tienen dos caminos posibles (Georgi y Georgi, 1994):

- **Migración traqueodigestiva:** Esta ocurre generalmente en cachorros menores de 6 semanas, y se inicia cuando la mayoría de las larvas atraviesan los alvéolos y avanzan por el árbol bronquial para ser deglutidas con las secreciones traqueobronquiales. Pasan por el esófago hasta el intestino donde mudan a larva V (L-V), alcanzando el estado adulto a las 3-5 semanas post infección, con la consiguiente eliminación por las heces. Una pequeña proporción de las larvas permanecen en la circulación hasta ser filtradas por otro lecho capilar y encapsuladas por una reacción tisular, donde permanecerán infectantes por meses o años.

- **Migración Somática:** Sucede en los perros de 6 semanas en adelante, en donde la mayor parte de las L-II que llegan a los pulmones ya no pasan a la luz alveolar, sino que continúan en la circulación y son distribuidas por el organismo. Las larvas invaden los pulmones, hígado,

riñones, útero, glándulas mamarias, músculos esqueléticos, etc. permaneciendo acantonadas en ellos durante meses y años, sin proseguir su desarrollo. Esta migración somática, que cobra más importancia con la edad del perro, también tiene lugar cuando el hombre y otros hospedadores no habituales se infectan con huevos larvados de *T. canis* (Cordero y Rojo, 1999).

En las perras a partir del día 40-42 de gestación, las larvas somáticas que permanecen en reposo, se activan en útero y movilizan hacia la placenta y glándulas mamarias. El estado inmunitario y hormonal determina la reactivación de las larvas tisulares, pasando en su mayor parte a través de la placenta hacia el hígado del feto, y durante el periodo de lactancia a través de las glándulas mamarias. Después del nacimiento, las larvas maduran a los 21 días posparto, pasando los cachorros a contaminar el medio con huevos. Durante el periodo de lactancia la hembra puede desarrollar una infección patente por *T. canis* como resultado de la ingestión de cuartos estadios larvarios incapaces de establecerse en los cachorros y eliminados con las heces de éstos. Estos cuartos estadios larvarios son ingeridos por las hembras al lamer sus cachorros y al retirar sus heces de la cama. Al menos una parte de estos maduran al encontrarse con esta segunda oportunidad de evolución. En perras de experimentación se ha observado el desarrollo regular de infecciones patentes 25 a 46 días después del parto (Georgi y Georgi, 1994).

El mecanismo principal de infección de perros por *T. canis* es el transplacentario y, en segundo término, el transmamario. Entre el 95,5% y el 98,5% de los ascáridos intestinales los adquieren los cachorros por vía placentaria (Cordero y Rojo, 1999).

Las perras son consideradas hospedadores paraténicos de *T. canis*, porque las larvas de este parásito residen en sus tejidos durante prolongados periodos de tiempo sin experimentar desarrollo alguno, hasta ser transferidas a los cachorros. Otros animales que actúan como hospedadores paraténicos de *T. canis* son las lombrices de tierra, los roedores, las aves, el ganado ovino y el porcino; los cuales también representan una fuente de infección para los perros que los consumen. Preparaciones de tejidos triturados de ratones de campo y otros pequeños animales capturados por los perros y gatos rurales frecuentemente contienen larvas de *Toxocara* (Georgi y Georgi, 1994).

#### **4- Daños causados al hospedador::**

Los estudios de las alteraciones clínicas y clínico patológicas asociadas con la infección prenatal por *T. canis* son escasos. Uno de ellos utilizó a cinco perras adultas libres de helmintos, de las cuales una se mantuvo como control y las cuatro restantes fueron infectadas con una dosis oral de 20.000 huevos de *T. canis* 10 días antes de la monta. Los cachorros obtenidos de una de las perras infectadas presentaron cargas masivas y todos ellos murieron entre el día 22 y 49. Las causas de dicha muerte fueron, hemorragias y/o peritonitis, debido a la perforación de la pared intestinal por parte de los estadios larvarios y/o adultos de *T. canis* que iniciaban o terminaban su migración respectivamente (ciclo de Loos). La mucosa gástrica de todos los cachorros infectados masivamente se encontraba marcadamente engrosada. Los cachorros pertenecientes a las otras tres camadas infectadas sufrieron infecciones más moderadas, pero presentaron discrasias sanguíneas y pesaron 1 a 2 Kg. menos que los perros control a las 12 semanas de edad (Georgi y Georgi, 1994).

La disparidad en la intensidad de la infestación entre camadas de hembras sometidas a idéntica exposición, es particularmente interesante y concuerda con la observación que la toxocarosis tiende a afectar a determinadas camadas, mientras que otras permanecen relativamente sanas. Esto nos lleva a concluir que la intensidad de la infección y el grado de enfermedad experimentada depende más del nivel de resistencia individual a la infección, que del número de larvas infectantes a los que se expone el hospedador. Esta mayor o menor capacidad de resistencia individual va mas allá de los mecanismos de inmunidad humoral y celular, ya que las diferencias fenotípicas de constitución, fisiología y comportamiento seguramente desempeñan un papel importante. Así también determinadas deficiencias nutricionales pueden influir directamente sobre la evolución de la infección parasitaria, así como indirectamente a través del desgaste general de los recursos necesarios para el funcionamiento normal del organismo (Georgi y Georgi, 1994).

Las larvas en migración de *T. canis* producen alteraciones inflamatorias en sus hospedadores definitivos naturales así como en el hombre y en otros hospedadores paraténicos. Por ejemplo, los granulomas focales que rodean a las larvas son evidentes en los riñones de perros expuestos a gran número de huevos infectantes (Georgi y Georgi, 1994).

Uno de los pocos estudios epidemiológicos realizados para cuantificar daños causados por *T. canis* en su hospedador natural muestra que el 39% de los perros pastores rurales de Nueva Zelanda presentaron larva migrans ocular, posiblemente causada por *T. canis* y manifestada por una retinitis multifocal. Esta cifra disminuyó a un 9% cuando se realizó el mismo estudio en perros urbanos de ese país. La exposición a un gran número de huevos de *T. canis* en suelos muy contaminados fue considerado causa de la mayor prevalencia entre los perros rurales (Georgi y Georgi, 1994).

### **5- Epidemiología:**

El *T. canis* es un parásito común en todo el mundo. Diversos estudios señalan que la infección en la población canina oscila entre 2 y 93% en diferentes regiones del mundo (Stiles, 1963; Worley, 1964; Burke, 1977). En nuestro país la infección en perros menores de un año va desde un 23% a un 40% (Alcaíno y Tagle, 1970; Oberg *et al.*, 1979). En 1999 se efectuó un estudio que consistió básicamente en la recolección de muestras fecales de perros en 84 plazas y 12 parques de 32 comunas del gran Santiago. Se obtuvieron 3 muestras de heces de diferentes lugares de cada plaza o parque logrando un total de 288 muestras, las cuales fueron sometidas a examen microscópico para detectar huevos de *T. canis*. Este estudio permitió tener una visión panorámica de la presencia de dicho gusano en el área referida, lo cual hizo posible efectuar una evaluación estimativa del riesgo potencial que representa para la salud humana dicha parasitosis canina en lugares tan concurridos como plazas o parques. Es así como se determinó la presencia de huevos de *T. canis* en el 13,5% de las muestras (39/288); la frecuencia de detección de huevos del gusano según sitio de recolección de la muestra fue de un 37,5%, es decir se encontraron muestras positivas en 36 de los parques y plazas estudiados de un total de 96. Por último se presentó contaminación ambiental por huevos de *T. canis* en el 74% de las comunas (24/32). En este mismo estudio se demostró que un 5,1% de las muestras que presentó huevos de *T. canis*, tenía huevos larvados, esto demuestra que la materia fecal de perro se mantuvo por semanas en las plazas o parques públicos estudiados (Castillo *et al.*, 2000).

Por otra parte, en un estudio realizado en 1987 destinado a determinar la contaminación de las tierras de algunas plazas públicas de Santiago, se encontraron huevos de *Toxocara sp.* en el 10,7% de las muestras recolectadas (tres positivas de un total de 28) (Salinas *et al.*, 1987).

Estudios similares realizados en otros países señalan la presencia de huevos de *T. canis* en el 25% de los parques públicos de Gran Bretaña (Dublín *et al.*, 1975), en tanto que entre el 10% y el 30% de lugares de juegos en EEUU estarían contaminados (Worley *et al.*, 1984). A su vez, se hallaron estas formas infectantes en el 92% de áreas rurales en Salamanca (España), y en Japón entre el 63% y 87,5% de los arenales de juegos de los niños estaban contaminados por estos huevos (Atias, 1999)

Por todo lo anteriormente dicho, *T. canis* representa una importante amenaza para la salud de las personas, especialmente de los niños debido a que a su corta edad carecen de los hábitos de higiene necesarios para disminuir el riesgo de infección. Esto sumado al estrecho contacto de éstos con sus mascotas, al hábito de muchos de ellos de comer tierra y a que precisamente los lugares de juego de los niños son los más contaminados. En el suelo de los parques públicos, de los patios de recreo, de las perreras, de los jardines urbanos y de otros lugares donde los perros defecan con regularidad, se acumulan altas concentraciones de huevos infectantes de este parásito. Incluso pequeñas cantidades de tierra de suelos muy contaminados, vehiculizan muchos huevos de *T. canis* y estos pasarían fácilmente de las manos sucias al interior del organismo. Por todo lo anterior, y considerando el número de perros domésticos y la prevalencia de la infección por ascariidos, parece poco probable que existan personas que estén completamente libres de larvas de *T. canis*.

Estudios serológicos practicados en población humana presuntamente sana de diversos países del mundo, demuestran una positividad de 25% en California, de 54% en Pensilvania y de un 2% en Inglaterra. En Italia se han reportado cifras del orden del 4,4% en población general, de 9,2% en pacientes epilépticos, y de 10,6% a 87,5% en personas con retardo mental (Atias, 1999).

Mención aparte tienen las seroprevalencias encontradas en dos islas tropicales: Santa Lucía y La Reunión, donde las seroprevalencias son del 86% y 92,8% respectivamente. Los estudios prevalenciales realizados en estas islas señalan que la toxocariasis es la más común de las helmintiasis, a pesar que están separadas por 20.000 Km. de distancia (Magnaval *et al.*, 1994).

En Chile, la prevalencia descrita en población adulta presuntamente sana es de un 8,8% (Herskovic y Astorga, 1985), en tanto que en niños asintomáticos es de 20% y en la población general con eosinofilia es de 25% (Noemí y Rugiero, 1999).

#### **6- Cuadro clínico en humanos:**

**-Patogenia:** Cuando el hombre ingiere los huevos infectantes de estos nematodos, ocurre lo mismo que en el hospedero habitual, es decir, salen de ellos larvas, atraviesan la pared intestinal iniciando su migración por la circulación portal hasta el hígado, donde con frecuencia algunas quedan retenidas, mientras otras siguen por la circulación sistémica, pudiendo llegar prácticamente hasta cualquier órgano, especialmente pulmón, cerebro, ojos y corazón . En general, puede afectar prácticamente todos los parénquimas del cuerpo, pero con mayor frecuencia se ha visto compromiso pulmonar y hepático (Beaver *et al.*, 1952; Snyder, 1961; Schantz *et al.*, 1979; Rockey *et al.*, 1979).

Este parásito ocasiona daño por diferentes mecanismos, siendo el más importante una reacción inflamatoria caracterizada al inicio, por la formación de granulomas eosinofílicos alrededor de la larva que tratan de encapsularla e inmovilizarla, a los que luego se agregan linfocitos y células epiteliales gigantes. Esta larva puede permanecer viable en los tejidos por meses o años (Rockey *et al.*, 1979). Posteriormente se produce la liberación de antígenos excretorios secretorios generados por el parásito, la elevación de IgE, IgG tipo 4 e interleucinas 4 y 5, completándose así la reacción inflamatoria.

El cuadro clínico es variable, desde casos asintomáticos y encubiertos (Magnaval, 1987; Rasmussen *et al.*, 1993) a severos con hepatomegalia, anemia, eosinofilia marcada y cuadros pulmonares recidivantes (Smith y Beaver, 1953; Dant *et al.*, 1956; Mok, 1968; Cypess, 1978).

También puede asociarse a trastornos conductuales, hiperactividad, encefalopatías, retardo mental, granulomas cerebrales, cefaleas y migrañas (Amy *et al.*, 1985; Fannig *et al.*, 1981; Marmor *et al.*, 1987). Se ha encontrado una mayor frecuencia de anticuerpos contra este agente en pacientes epilépticos o con retardo mental sumado a antecedentes de geofagia intensa (Noemí *et al.*, 1984)

Actualmente no está claro que factores determinan la manifestación de distintos cuadros clínicos en la toxocarosis humana. Es muy probable que dependa tanto de factores del hospedero, tales como su estado inmunológico, como de características propias del parásito, como por ejemplo su capacidad de evadir la respuesta inmune del paciente (Cypess, 1978; Loukas *et al.*, 2000a, b). Experimentalmente, se ha comprobado que la ingestión de 2.000 huevos larvados de *T. canis*, produce un cuadro de características sistémicas cuya duración oscila entre 12 y 36 meses (Mok, 1968; Burke, 1977; Barriga, 1989)

#### **-Sintomatología:**

- **Toxocarosis asintomática:** No presenta signos o síntomas propios. Evoluciona con o sin eosinofilia elevada (Noemí y Rugiero, 1999)
  
- **Toxocarosis sistémica:** la toxocarosis sistémica es predominante en niños de 1 a 7 años con antecedentes de pica o geofagia y dueños de mascotas. Habitualmente pueden presentar síntomas generales, como anorexia, astenia e irritabilidad, fiebre y manifestaciones cutáneas (eccema, urticaria, erupciones pruriginosas o eritema) (Humber *et al.*, 2000). El compromiso sistémico se manifiesta a nivel de pulmón (bronquitis obstructivas recidivantes, neumonitis o bronquitis agudas); del hígado (hepatomegalia, nódulos hiper ecogénicos en la ecotomografía); esplenomegalia; compromiso del SNC (convulsiones, trastornos conductuales, hiperactividad e incluso hemiplejia); y miocardiopatía que puede llevar a una insuficiencia cardiaca (Fiedman y Henada, 1960; Schantz *et al.*, 1979; Rasmussen *et al.*, 1993; Noemí y Rugiero, 1999).

En el hemograma se puede observar desde recuentos de eosinófilos normales a eosinofilia, hipergammaglobulinemia con predominio de IgG, IgM y marcada elevación de IgE (Atias, 1999).

- **Toxocarosis ocular:** Especialmente grave es el compromiso ocular que se presenta en niños de mayor edad (6-14 años), generalmente varones y cuyas manifestaciones clínicas más relevantes son: disminución de la agudeza visual (93% de los pacientes), exotropia (60%),

leucocoria (27%) e inflamación del segmento anterior (27%). Sólo el 7% de los niños en que se compromete este órgano, queda con una visión aceptable (Atias, 1999).

Al examen de fondo de ojos se puede hallar una masa periférica en el 33% de los casos, granuloma macular en el 27%, endoftalmitis y granuloma vítreo en el 26%, así también como granuloma del nervio óptico en el 7% y alteración difusa del epitelio pigmentario con vitreitis en el 7% (Atias, 1999).

Cuando existe compromiso ocular, frecuentemente el cuadro cursa sin eosinofilia. En estas condiciones, es de utilidad el examen de fondo de ojos, en el que se puede observar una larva en segundo estadio (Atias, 1999).

- **Toxocarosis emergente o atípica:** Se caracteriza por cursar con sintomatología difusa e inespecífica: dolor abdominal, compromiso articular, alteraciones del progreso ponderal, cefalea, urticaria, etc. (Noemí y Rugiero, 1999).

## **7- Diagnóstico:**

Se basa en la sospecha clínica, en los antecedentes de geofagia y de contacto con cachorros, un cuadro clínico compatible, leucocitosis y eosinofilia (esta última no siempre existe) (Rasmussen *et al.*, 1993), e isoaglutininas anti A o anti B elevadas (Newman, 1978). La confirmación diagnóstica se logra mediante la reacción de ELISA, usando antígeno excretado-secretado de *T. canis*, ensayo que tiene una sensibilidad entre un 70% y un 91% y una especificidad que oscila entre el 76,9% y el 100% (Herskovic *et al.*, 1986). Para Chile se consideran positivos títulos de 1/64. Recientemente se han ensayado otras técnicas para el diagnóstico, las cuales aún están en evaluación como son el Dot-ELISA, la inmunofluorescencia y la inmunoelectroforesis.

En casos sistémicos, especialmente con compromiso hepático, se han utilizado biopsias con lo cual se puede observar el parásito; sin embargo, por tratarse de un procedimiento a ciegas, tiene un bajo rendimiento, aunque en la mayoría de los casos permite observar el granuloma sin visualizar el agente (Schantz y Glickman, 1978)

En los cuadros oculares, la prueba de ELISA puede ser negativa o positiva a títulos bajos, siendo de utilidad el examen de fondo de ojos, y el examen de ELISA en humor vítreo o acuoso. En este caso, estos líquidos pueden tener títulos más elevados que los encontrados en suero. En esta localización también es de utilidad el diagnóstico por imágenes (ecotomografía ocular o tomografía axial computarizada) (Atias, 1999)

La complejidad y el escaso conocimiento que existe respecto a la toxocarosis humana, que afecta probablemente a más personas de las que se cree, nos lleva a plantearnos los siguientes objetivos con el fin de aportar al conocimiento de la toxocarosis humana a través de un modelo experimental.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Caracterizar la distribución o migración de larvas de *T. canis*, obtenidas de tres zonas diferentes del país, por órganos y la respuesta inmune humoral asociada a un modelo murino

### **Objetivos específicos**

1. Conocer si las larvas de *T. canis* obtenidas de las tres zonas del país, se distribuyen en forma diferente en órganos o tejidos de acuerdo al tiempo transcurrido desde la infección.
2. Determinar la relación entre las larvas de *T. canis* obtenidas de las tres zonas del país y su distribución o migración en los diferentes órganos o tejidos.
3. Conocer si existe un reconocimiento antigénico que diferencie las larvas de *T. canis* obtenidas de las tres zonas del país.
4. Conocer si existe relación en el reconocimiento antigénico de las larvas de *T. canis* obtenidas de las tres zonas del país y la distribución de *T. canis* en los órganos.

## MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron 108 ratones albinos hembras (*Mus musculus*, cepa BALB/c) provenientes del Instituto de Salud Publica, cuyas edades fluctuaron entre las 8 y 12 semanas. Todos los individuos se infectaron intraesofágicamente con 1.000 huevos larvados de *T. canis*, obteniéndose muestras de suero antes y después de la infección, de cada uno de ellos.

### **Inóculo:**

#### ➤ **Obtención de huevos larvados:**

Huevos sin larvar (no infectantes) se obtuvieron a partir de muestras de hembras de *T. canis* adultas provenientes de cachorros de perros **de tres zonas del país: norte, centro y sur.**

Los cachorros seleccionados debían tener entre 1 a 6 meses de edad, y fueron desparasitados con levamizol con el fin de obtener gusanos adultos enteros, en buenas condiciones. Una vez obtenida la muestra, fue conservada en formalina al 10% hasta el momento de la obtención de los huevos.

Para la recolección de los huevos, se realizó la disección de las hembras de *T. canis* para obtener el contenido uterino. Este fue suspendido en agua bidestilada y conservado en placas petri, marcadas con la zona de procedencia de los gusanos, en una estufa a 25°C y en presencia de humedad con el fin de dar las condiciones ideales para la evolución de los huevos hasta alcanzar el estado evolutivo de LII o huevo infectante.

Pasado un mes de incubación se procedió a tomar una muestra de cada placa petri, para observar si los huevos ya estaban larvados. Se observaron algunos huevos larvados, larvas eclosionadas del huevo y huevos sin larvar. Una semana después se disminuyó la temperatura a 10°C hasta que estuviera disponible la primera partida de ratones a infectar.

Una vez que estuvieron disponibles los ratones, se procedió a aumentar nuevamente la temperatura a 25°C y se tomaron semanalmente, muestras de cada placa petri hasta que se observaron solamente huevos larvados.

➤ **Recuentos de huevos y preparación del Inóculo:**

El contenido de cada placa petri fue colocado en un tubo marcado con la región de procedencia de la muestra y centrifugado a 500 g por 30 minutos. Se realizaron 5 lavados y centrifugados del contenido de cada placa petri hasta dejar 3 tubos, correspondiente a las diferentes zonas de muestreo (norte, centro, sur), con un volumen total de 15 ml.

Las muestras así obtenidas, fueron tamizadas y se centrifugaron por 40 minutos a 500 g. Parte del sobrenadante, fue eliminado, y la muestra se trasladó a un tubo más pequeño para posteriormente ser centrifugada durante 20 minutos. El sobrenadante fue eliminado, para dejar sólo 5 ml de volumen total.

Se tomaron 0,5 ml de cada muestra, los cuales fueron diluidos en 4,5 ml de agua saturada con cloruro de sodio. Esta nueva solución fue homogenizada y con ella se realizó el recuento de los huevos en una cámara de Mc Master.

### **Infección experimental**

➤ **Diseño experimental:**

Se utilizaron cepas de ratones BALB/c, que han demostrado ser más sensibles a la infección con *T. canis*, todas hembras de dos a tres meses de edad. Se utilizó un tamaño muestral de 36 ratones, con una potencia de 80%, un nivel de significancia del 5% y una desviación estándar de 17 para un promedio de 40 larvas por órgano, determinado a través de la siguiente fórmula:

$$n = 2(Z_s + Z_p)^2 \times S / (M_a + M_b)^2$$

Donde n: corresponde al tamaño muestral; p: potencia; Z: nivel de confianza; S: desviación estándar de los valores individuales y  $(M_a + M_b)^2$ : diferencia entre los promedios.

Se utilizó un total de 108 ratones divididos en nueve grupos de 12, de acuerdo al inóculo y a la fecha de sacrificio post infección, como se muestra en el siguiente cuadro

**Cuadro I: distribución de los grupos de ratones infectados según zona de procedencia de las larvas (norte, centro y sur) y día de sacrificio post infección (7, 14 o 30 días)**

<i>Grupo</i>	<i>Nº de ratones por grupo</i>	<i>Zona de procedencia de larvas</i>	<i>Día de sacrificio post infección</i>
Grupo N7	12	Norte	7
Grupo N14	12	Norte	14
Grupo N30	12	Norte	30
Grupo C7	12	Centro	7
Grupo C14	12	Centro	14
Grupo C30	12	Centro	30
Grupo S7	12	Sur	7
Grupo S14	12	Sur	14
Grupo S30	12	Sur	30

N: zona norte; C: zona centro; S: zona sur.

Los ratones fueron infectados con una dosis de 1.000 huevos larvados, dados directamente al esófago mediante una branula de 22 G de 2 centímetros de largo, previa anestesia con cloroformo. La eutanasia de los ratones se realizó con una sobredosis de anestesia.

#### **Obtención de los sueros:**

Los sueros se obtuvieron a partir de muestras de sangre extraídas por un corte longitudinal de la vena caudal de la cola, previamente dilatada mediante calor. La sangre se recolectó en tubos “ependorf” y se dejó reposar por 24 horas a temperatura ambiente con un trozo de vidrio en su interior. Pasadas las 24 horas se extrajo el coágulo con el vidrio y se centrifugó la muestra 10.000 g por 5 minutos. Estas muestras se obtuvieron antes de la infección experimental, y luego semanalmente hasta el sacrificio de los ratones.

**Recolección de larvas:**

Una vez sacrificados los ratones se obtuvieron separadamente los siguientes tejidos: cerebro incluyendo los ojos, el hígado incluyendo el bazo, los pulmones, los riñones, el corazón, la musculatura de la cabeza y la carcasa.

Cada órgano fue colocado en un tubo identificando el nombre del órgano, la zona de procedencia y el día de sacrificio, para iniciar el proceso de digestión con pepsina al 0,1% y ácido clorhídrico al 0,75% a 37°C (Concepción y Barriga, 1985) por 4 horas, obteniendo así una solución que fue filtrada y centrifugada a 500 g por 20 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el “pellet” se fijó en formalina al 5% con el fin de preservar la muestra hasta el recuento de las larvas.

**Recuento de larvas:**

El recuento de larvas se realizó a través de microscopía óptica previa tinción con cristales de verde malaquita (Barriga y Myser, 1987). La muestra se centrifugó y diluyó hasta que fue posible su observación en un porta objetos. La muestra fue homogenizada y de ella se tomaron 10 muestras de 50 microlitros cada una y el resultado fue extrapolado a toda la muestra. Cuando la muestra fue pequeña, se observó en su totalidad.

**Obtención del antígeno larval:**

Los antígenos excretados-secretados se obtuvieron de larvas de *T. canis*. Las larvas recolectadas fueron lavadas con una solución salina estéril y centrifugadas a 500 g por 2 minutos sucesivamente. Se esperó hasta que todas las larvas eclosionaron y posteriormente fueron lavadas e incubadas en un medio de cultivo (RPMI), donde cada dos semanas, aproximadamente, se retiraron sus productos de excreción-secreción, los cuales fueron conservados a -20° C. Cuando se obtuvo una cantidad significativa, estos fueron sometidos a ultracentrifugación y liofilizados hasta un volumen de 3 ml aproximadamente. Finalmente, se midió la concentración proteica utilizando la técnica de Bradford (1976)

## **Técnica de SDS PAGE**

### 1. Preparación de la muestra:

Se tomaron 100 µg del antígeno y se le adicionaron 60 µl de la solución buffer de muestra 3X pH 6,8 y 30 µl de betamercaptoetanol (BME, Bio Rad); posteriormente todo fue hervido por 4 minutos para lograr la desnaturalización de las proteínas.

### 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida:

Una vez obtenidos los preparados antigénicos, se procedió a realizar con cada uno de ellos la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en ambiente reductor (SDS-PAGE). Se llevó a cabo en mini geles de 8x7x1.5 mm, en una cámara vertical Mini Protean II (BIO-RAD), en condiciones denaturantes, con una peinetas continua. Se utilizó un gel de corrida al 15% de acrilamida estándar y geles concentradores al 4,5% de acrilamida estándar. En el carril lateral se incluyó el marcador de peso molecular comercial estándar (SDS-7 sigma) que contenía polipéptidos de 200 a 14 kDa. En el carril contiguo se incluyeron 100 µl del preparado antigénico E-S. La cámara fue llenada con buffer de corrida. Inicialmente los geles fueron sometidos a una diferencia de potencial de 100 V, hasta que el frente de la corrida alcanzó el borde inferior del gel concentrador y luego a 150 V hasta el final de la corrida. Una vez finalizada la corrida, cada gel fue teñido con azul de Coomassie, para así poder determinar y visualizar las bandas proteicas que constituyeron este preparado.

## **Western Blot:**

Una vez comprobada la existencia de las bandas proteicas, se procedió a transferirlas a membranas de nitrocelulosa. Previamente los geles, los papeles filtro y la nitrocelulosa fueron equilibrados en buffer de transferencia. Posteriormente se colocó sobre la cámara dos papeles filtro, membrana de nitrocelulosa, un gel y dos 2 papeles filtro. La electrotransferencia se realizó a 100 V por 90 minutos a 4°C.

Concluida la electrotransferencia, la nitrocelulosa fue teñida con rojo Ponceau para verificar la transferencia de las proteínas del gel en la membrana. El carril correspondiente al peso molecular estándar en la membrana de nitrocelulosa fue cortado e identificado con el

numero del gel, siendo luego teñido con amidoblack. Los geles fueron teñidos con azul de coomasie, para comprobar la transferencia, verificando así la ausencia de bandas. El colorante de la nitrocelulosa fue removido mediante lavados con buffer fosfato salino pH 7,2 (PBS). Luego los trozos de membrana fueron incubados durante una hora en una solución de leche descremada al 5% en PBS-Tween 20 al 0,5% (PBS-T-L) con el fin de bloquear sitios inespecíficos. Las membranas bloqueadas fueron guardadas en papeles filtros a  $-4^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

Las membranas fueron cortadas y cada tira fue identificada con el pool de sueros al que sería enfrentadas (N7, N14, N30, C7, C14, C30, S7, S14, S30 y control); cada tira se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación suave, en una solución que contenía 20  $\mu\text{l}$  de suero de los animales en estudio y 880  $\mu\text{l}$  de PBS-T-L en leche descremada al 3%. Posterior a la incubación, fueron sometidos a 5 lavados de 5 minutos cada uno en PBS-T 0,5% y confrontados contra el conjugado anti Ig G de ratón, anti Ig-A de ratón y anti Ig M de ratón durante 2 horas. Después de 3 lavados con PBS-T 20 y 2 con PBS solo, de 5 minutos cada uno, las tiras fueron reveladas con el sustrato (diaminobenzidina, PBS y  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) hasta la aparición de bandas color café, reacción que se detuvo sumergiendo las tiras en agua destilada.

#### **Análisis de resultados:**

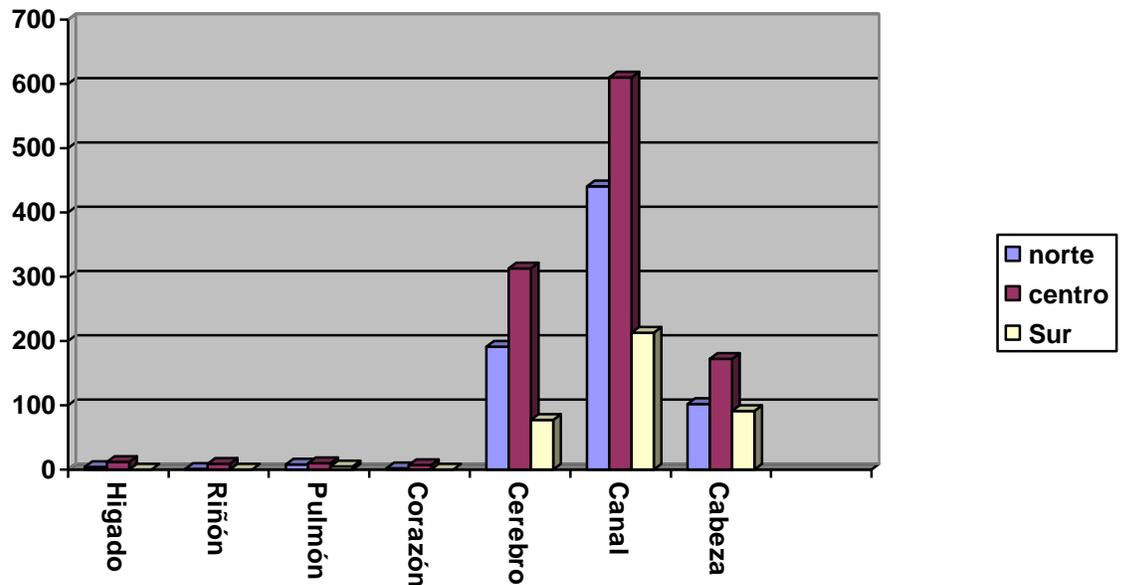
Para poder determinar si existían diferencias significativas entre el número promedio de larvas por gramo encontradas en cada órgano por zona y tiempo, se realizó un análisis de varianza con diseño factorial y se utilizó “Student – Newman- Keuls” (SNK) como prueba de comparaciones múltiples (SAS system).

## RESULTADOS

La suma del número de larvas de *T. canis* recobradas por cada grupo de ratones en cada uno de los órganos analizados, se presenta en el cuadro II:

**Cuadro II: Número de larvas de *Toxocara canis* recuperadas de hígado, riñón, pulmón, corazón, cerebro, canal y cabeza de ratones hembras BALB/c infectados con larvas provenientes de la zona norte, centro y sur a los 7, 14 y 30 días post sacrificio.**

Zona Día	Hígado			Riñón			Pulmón			Corazón			Cerebro			Canal			Cabeza			Total
	N	C	S	N	C	S	N	C	S	N	C	S	N	C	S	N	C	S	N	C	S	
<b>7</b>	4	0	0	0	2	0	3	2	0	1	3	0	27	24	39	50	46	66	6	18	36	<b>327</b>
<b>14</b>	0	0	0	0	2	0	5	0	5	1	0	0	82	61	22	269	202	83	66	29	45	<b>872</b>
<b>30</b>	0	12	0	1	5	0	0	8	0	0	4	0	82	228	16	122	362	64	30	125	10	<b>1069</b>
<b>Total</b>	4	12	0	1	9	0	8	10	5	2	7	0	191	313	77	441	610	213	102	172	91	<b>2268</b>



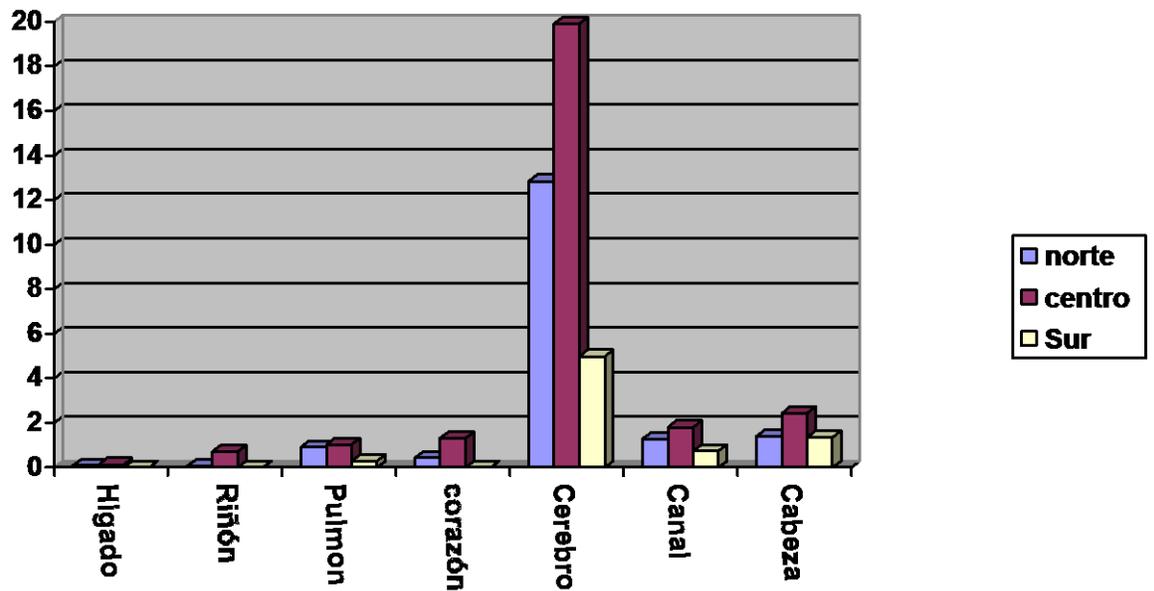
**Figura I: Representación gráfica del número de larvas totales de *Toxocara canis* recuperadas de hígado, riñón, pulmón, corazón, cerebro, canal y cabeza de ratones hembras BALB/c infectadas con larvas provenientes de la zona norte, centro y sur.**

En la figura I se aprecia que el mayor número de larvas fue recuperado de órganos de ratones infectados con el aislado de la zona central del país, y principalmente de cerebro, carcasa y cabeza. A su vez la menor cantidad de larvas se obtuvo de ratones infectados con el aislado de la zona sur.

Posteriormente los resultados fueron expresados como larvas por gramo de órgano y se promediaron debido a la disparidad en los tamaños y pesos de los órganos analizados (cuadro III)

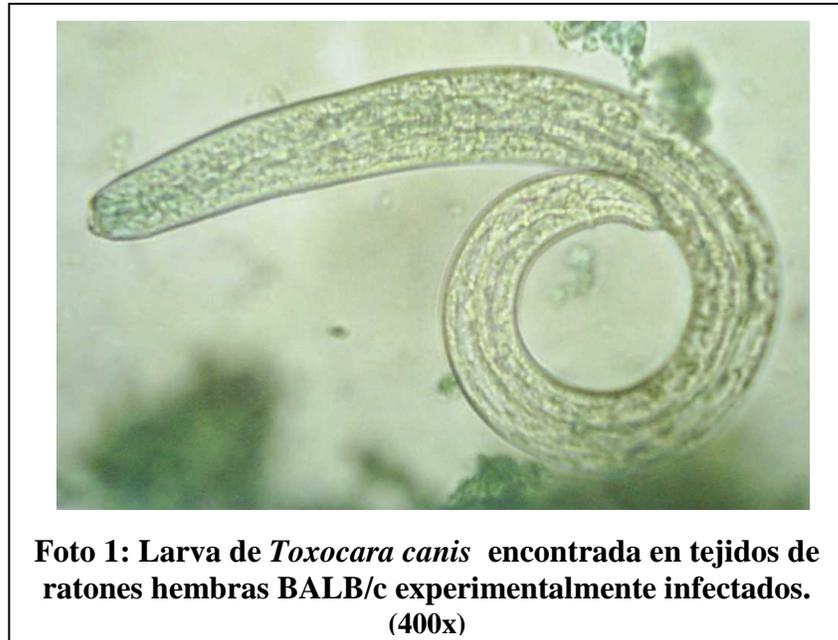
**Cuadro III: Número de larvas de *Toxocara canis* encontradas por gramo de hígado, riñón, pulmón, corazón, cerebro, canal, cabeza de ratones hembras BALB/c infectados con larvas provenientes de la zona norte, centro y sur a los 7, 14 y 30 días post sacrificio**

Zona Día	Hígado			Riñón			Pulmón			Corazón			Cerebro			Canal			Cabeza		
	N	C	S	N	C	S	N	C	S	N	C	S	N	C	S	N	C	S	N	C	S
7	0,29	0	0	0	0,83	0	1,32	0,76	0	0,93	2,08	0	6,48	4,96	7,26	0,53	0,57	0,75	0,34	0,84	1,62
14	0	0	0	0	0,54	0	1,45	0	0,87	0,4	0	0	15,98	10,76	4,49	2,44	2,04	0,84	2,78	1,28	2,05
30	0	0,44	0	0,19	0,84	0	0	2,36	0	0	1,92	0	16,06	44,04	3,24	0,94	2,86	0,66	1,1	5,25	0,46
Prom. Zona (l/g)	0,09	0,14	0	0,06	0,73	0	0,92	1,04	0,29	0,44	1,33	0	12,84	19,91	4,99	1,30	1,82	0,75	1,40	2,45	1,37



**Figura II: Representación gráfica del número promedio de larvas de *Toxocara canis* encontradas por gramo de hígado, riñón, pulmón, corazón, cerebro, canal, cabeza de ratones hembras BALB/c infectadas con larvas provenientes de la zona norte, centro y sur**

En la figura II podemos ver que la mayor cantidad de larvas encontrada, por gramo de tejido, fue en cerebro.



Estadísticamente, las diferencias significativas entre promedios encontradas por órgano fueron las siguientes:

- Canal:

**Por zona:** El promedio de larvas encontradas en la zona central fue estadísticamente mayor al promedio de larvas encontradas en la zona sur. El promedio de larvas encontradas en la zona norte fue similar a los promedios tanto de la zona centro como de la zona sur.

**Por tiempo:** El promedio de larvas encontradas en la carcasa a los 7 días fue significativamente menor al encontrado a los 14 y 30 días post infección.

**Cuadro IV: Distribución promedio de larvas de *T. canis* (larvas por gramo) encontradas en carcasa de ratones hembras BALB/c infectados con 1000 huevos larvados, a diferentes días de infección y con distintos aislados del país (zonas)**

Zona/días	7 días	14 días	30 días	Promedio zona (l/g)
NORTE	0,53	2,44	0,94	<b>1,3 ab</b>
CENTRO	0,57	2,04	2,86	<b>1,8 a</b>
SUR	0,75	0,84	0,66	<b>0,75 b</b>
Promedio día (l/g)	<b>0,62 b</b>	<b>1,77 a</b>	<b>1,48 a</b>	Diferente letra p<0,05

(l/g) = larvas por gramo

- Cerebro:

**Por zona:** El promedio de larvas encontradas en la zona central fue estadísticamente mayor al promedio de larvas encontradas en la zona sur, el promedio de larvas encontradas en la zona norte fue similar a los promedios tanto de la zona centro como de la zona sur.

**Por tiempo:** El promedio de larvas encontradas en el cerebro a los 30 días fue significativamente mayor al encontrado tanto a los 7 como a los 14 días.

**Cuadro V: Distribución promedio de larvas de *T. canis* (larvas por gramo) encontradas en cerebro de ratones hembras BALB/c infectados con 1000 huevos larvados, a diferentes días de infección y con distintos aislados del país (zonas)**

Zona/días	7 días	14 días	30 días	Promedio zona (l/g)
NORTE	6,48	15,98	16,06	<b>12,84 ab</b>
CENTRO	4,96	10,76	44,04	<b>19,92 a</b>
SUR	7,26	4,49	3,24	<b>4,99 b</b>
Promedio día (l/g)	<b>6,2 b</b>	<b>10,4 b</b>	<b>21,11 a</b>	Diferente letra p<0,05

(l/g) = larvas por gramo

Riñón:

**Por zona:** El promedio de larvas encontradas en la zona central fue estadísticamente mayor al promedio de larvas encontradas tanto en la zona norte como en la zona sur, siendo estos últimos dos promedios estadísticamente similares.

**Por tiempo:** No existieron diferencias estadísticamente significativas en los promedios.

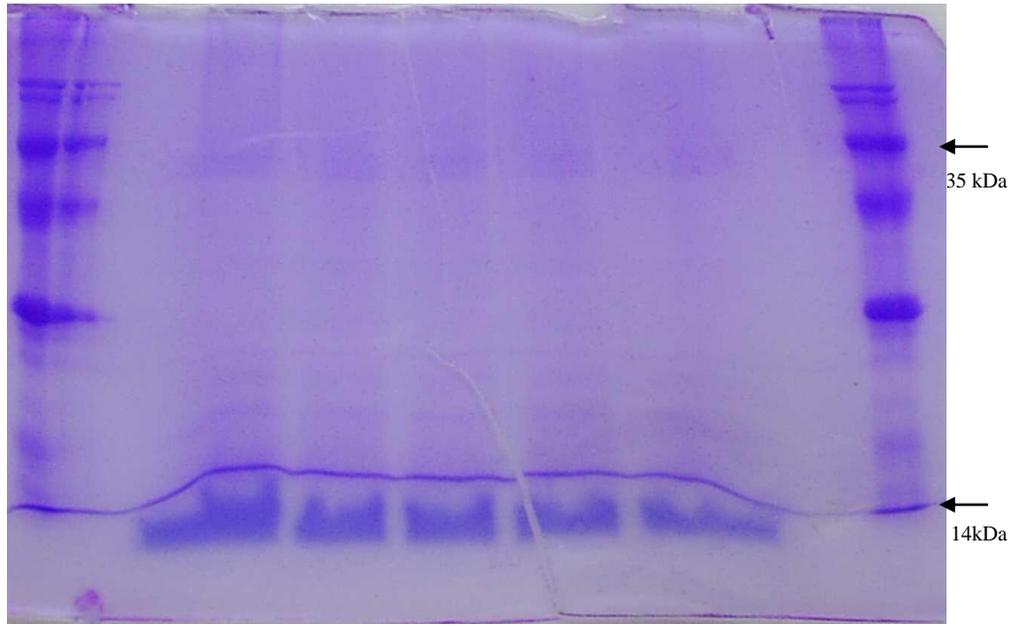
**Cuadro VI: Distribución promedio de larvas de *T. canis* (larvas por gramo) encontradas en riñón de ratones hembras BALB/c infectados con 1000 huevos larvados, a diferentes días de infección y con distintos aislados del país (zonas)**

Zona/días	7 días	14 días	30 días	Promedio zona (l/g)
NORTE	0	0	0,19	<b>0,06 b</b>
CENTRO	0,83	0,54	0,84	<b>0,73 a</b>
SUR	0	0	0	<b>0,00 b</b>
Promedio día (l/g)	<b>0,27 a</b>	<b>0,18 a</b>	<b>0,34 a</b>	Diferente letra p<0,05

(l/g) = larvas por gramo

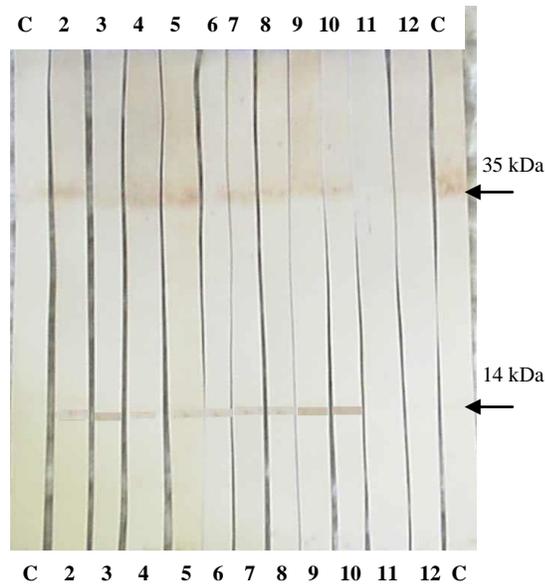
En el resto de los promedios comparados no existió diferencia

Desde el punto de vista inmune humoral, a través de SDS-page se logró separar los polipéptidos y evidenciar que el preparado excreción-secreción de *T. canis* tiene un complejo perfil proteico antigénico (foto 2), el cual mediante Western blot de los sueros de los ratones arrojó solo una banda específica de alrededor de 14 kDa y otra de alrededor de 35kDa que fue reconocida en forma inespecífica. Ambos polipéptidos fueron reactivos a Inmunoglobulina G, no así a inmunoglobulina A ni M. El polipéptido de 14 kDa fue reconocido por todos los sueros de los ratones infectados independiente del aislado o del tiempo de infección (foto 2).



**Foto 2: SDS-PAGE (15%) de un preparado de excreción - secreción de larvas y huevos de *Toxocara canis* .**

(Carriles laterales incluyen peso molecular estandar; carriles centrales incluyen el preparado E-S de *T. canis*).



**Foto 3: Western Blot de un preparado de excreción - secreción de larvas y huevos de *Toxocara canis*, enfrentado a sueros detectores de ratones hembras BALB/c experimentalmente infectados con larvas de *T. canis* de diferentes zonas del país y en distintos días de infección.**

(Carriles C, 2 al 10 sueros IgG reactivos; siendo los carriles C: Control negativo, carriles 2,3,4: "pool" sueros ratones infectados, días 7, 14 y 30 respectivamente, con aislado zona norte; carriles 5,6,7: "pool" sueros ratones infectados, días 7, 14 y 30 respectivamente, con aislado zona centro; carriles 8,9,10: "pool" sueros ratones infectados, días 7, 14 y 30 respectivamente, con aislado zona sur. Los carriles 11 y 12: son sueros enfrentados a conjugados anti IgA y anti IgM respectivamente).

## DISCUSION

La mayoría de los estudios de toxocarosis realizados en humanos se han centrado en describir sus distintas manifestaciones clínicas, a pesar de esto muy poco se sabe sobre las causas que podrían provocar esta diversidad de presentaciones. Estas diferencias podrían apoyar la idea que existan cepas o razas de parásitos más o menos benignas, capaces de generar desde un cuadro asintomático a uno grave.

Debido a la escasa existencia de estudios similares a este, la fase experimental se basó básicamente en unos pocos trabajos previos en los que se realizó infección experimental en ratones con larvas de *T. canis*.

Para realizar la infección la cepa de ratones elegida fue la BALB/c, debido a que estudios previos sugieren que esta es una de las cepas más apropiadas para observar diferencias en la distribución de larvas de parásitos en los distintos órganos, vale decir sensible a la infección (Abo-Shehada y Helbert, 1989; Parsons y Grieve, 1990; Epe *et al.*, 1994; Cuellar *et al.*, 2001), debido a que en esta cepa la respuesta inmune puede ser mediada tanto por linfocitos T helper1 (Th1) y/o T helper 2 (Th2), es decir por la respuesta inmune celular como la humoral respectivamente. En cambio existen otras cepas de ratones que son resistentes a la infección por helmintos, ya que la respuesta inmune mediada solo por Th2 es protectora debido a su capacidad de eliminar o destruir a los helmintos. Ejemplos de esto son las cepas de ratones C57BL/10 y la C3H (Barriga, 1989). En cambio la respuesta mediada por Th1 es antagónica a la Th2, llegando en muchos casos a favorecer la infección del hospedero por helmintos, como resultó ser BALB/c a la infección con *T. canis*. Por otra parte, otro estudio demostró que la capacidad migratoria de las larvas en BALB/c es más rápida que en otras cepas como son la C57BL/10 o la C3H (Guillén, 1990). Todas estas características determinaron la elección de esta cepa para el presente trabajo.

En un trabajo realizado en 1976, se vió el efecto de diferentes dosis de huevos larvados en la distribución de larvas de *T. canis* en el ratón. Se utilizaron dosis de 200, 600 y 1.000 huevos larvados respectivamente. Los resultados demostraron, que el número de huevos larvados fue un factor determinante en la proporción de larvas recobradas posteriormente en

cada uno de los órganos (Kayes y Oaks., 1976). En otros estudios similares los rangos de dosis usadas fueron desde 250 a 2.000 huevos larvados (Concepción y Barriga, 1985; Parson y Grieve, 1990; Cuellar *et al*, 2001), en base a esto se estimó que una dosis de 1.000 huevos sería la apropiada para obtener resultados satisfactorios en el presente trabajo.

Para la obtención de sangre en ratones existían varias posibilidades, una de ellas fue la punción intracardiaca, que fue descartada por dejar lesiones irreversibles que podían llevar a la muerte prematura del ratón lo que interferiría con el desarrollo del estudio. Otra opción fue a partir del plexo retro orbital, pero también fue descartada por ser muy traumática, sobre todo porque se debían realizar muestras semanales. Finalmente se optó por la obtención de sangre desde la vena caudal de la cola. Si bien por este método la cantidad de sangre obtenida en forma individual fue muy inferior a las otras opciones, al trabajar con “pooles” de sangre esto no constituyó un impedimento.

Para la fase de recuperación de las larvas a partir de los órganos del ratón habían descritos varios protocolos para realizar la digestión y el reconocimiento de las larvas a través de tinciones. Sin embargo en esos estudios no se mencionaba el tiempo necesario de digestión, por lo que se determinó empíricamente a través de múltiples ensayos, hasta que finalmente se estableció que 4 horas fue un tiempo suficiente de digestión para recuperar las larvas.

En cuanto a la distribución de larvas totales por zona, la mayor cantidad de larvas fueron recuperadas de ratones infectados con el aislado de la zona centro, luego de la zona norte y muy por debajo la zona sur, sin embargo no se determinó si estas diferencias fueron estadísticamente significativas, pero a simple vista existió mayor capacidad de desarrollo y migración de las larvas provenientes de la zona central del país, y por el contrario, una menor capacidad de desarrollo y migración de las larvas provenientes de la zona sur. Asimismo, fue posible observar que a medida que aumentó el tiempo de infección en los ratones, mayor fue la cantidad de larvas recuperadas, sin embargo esto tampoco fue comprobado estadísticamente.

El órgano en el que se encontró la mayor cantidad de larvas independientemente de la zona y del tiempo, fue la canal. Sin embargo, si lo analizamos desde el punto de vista del número de larvas encontradas por gramo de tejido, la mayor cantidad de larvas se recuperó

principalmente de cerebro (12,58 larvas por gramo de órgano). Esto implica una carga muy alta, para un órgano tan pequeño y quizá estaría indicando cierta predilección de la larva por este órgano.

Por otra parte la menor cantidad total de larvas, se encontró en corazón, riñón e hígado. Sin embargo, si se analiza este valor como número de larvas por gramo de órgano, se comprueba que la menor cantidad de larvas se encontró en el hígado ya que sólo se obtuvieron 0,08 larvas por gramo de este órgano. Esto podría indicar, que el hígado sería el órgano de menor predilección para la larva. Este resultado se contrapone con los estudios realizados por Concepción y Barriga en 1985, donde al día 5 post infección, el número de larvas recuperadas en hígado fue superior a la cantidad de larvas encontradas tanto en pulmón como en cerebro; por ende también es altamente probable que estos dos días de diferencia con nuestro estudio, sean los responsables de la escasa cantidad de larvas encontradas en hígado. Esto último se explicaría por el acelerado metabolismo y la mayor susceptibilidad de esta cepa de ratones ya que su sistema inmune probablemente fue incapaz de retener las larvas en el hígado por más de 5 días. Sin embargo, en el trabajo de Barriga y Concepción, al igual que en nuestro estudio, al día 20 hay un aumento en la cantidad de larvas encontradas en cerebro y disminuye notoriamente la cantidad de larvas encontradas en hígado. Esto mismo se observó en otro estudio, donde la mayor cantidad de larvas en hígado se encontró en la primera y segunda semana post infección, para disminuir en la semana 3 y aumentar en la cuarta semana. Cabe destacar que en este caso la cepa utilizada fue ICR (Fan *et al.*, 1998). Otros autores demostraron en una cepa C57BL/6J, que la mayor cantidad de larvas en hígado se encontraron en el día 1 post infección, (Parsons y Grieve, 1990). Todos los antecedentes anteriores nos indican que independientemente de la cepa utilizada para la infección con *T. canis*, el “peak” de larvas en hígado debería producirse entre el día 1 y 5, por lo tanto es probable que la recuperación de larvas del hígado el día 7 post infección fuera muy tarde.

En cuanto a los polipéptidos reconocidos por los sueros, sólo uno de ellos fue reconocido en forma específica por los sueros provenientes de ratones infectados con los tres diferentes aislados a los tres tiempos de infección. Por lo tanto, no fue posible demostrar un reconocimiento antigénico que diferenciara los tres aislados y mucho menos relacionarlo con la distribución de larvas de *T. canis* en diferentes órganos. Sin embargo, el hallazgo de este

antígeno de alrededor de 14 kDa sería importante para realizar futuras investigaciones que permitieran la realización de pruebas diagnósticas más precisas para la toxocarosis.

Sería de interés a partir de este trabajo continuar los estudios de la toxocarosis humana a través de infecciones experimentales en ratones; utilizando otras cepas con diferentes susceptibilidades y realizando sacrificios más tempranamente para detallar la distribución de las larvas y determinar con mayor exactitud la predilección de las larvas para migrar a un determinado órgano, ya que este trabajo nos estaría indicando que las cepas de parásitos existentes en nuestro país son mucho más susceptibles a migrar a cerebro. Además, sería importante corroborar que efectivamente las cepas provenientes de la zona norte y central son más patógenas que las de la zona sur. Esto debería ser relacionado con la casuística de toxocarosis ocular o cerebral versus las otras presentaciones en nuestro país y la prevalencia de toxocarosis en la zona sur comparada con la zona norte y centro.

## CONCLUSIONES

- Se pudo establecer una clara predilección de migración de las larvas *T. canis* al cerebro de ratones, independiente de la zona de origen del parásito.
- La mayor cantidad de larvas de *T. canis* fue recuperada de ratones sacrificados el día 30 post infección.
- La mayor cantidad de larvas de *T. canis* fue recuperada de los ratones infectados con larvas provenientes de la zona central.
- Estadísticamente el promedio de larvas recuperadas de *T. canis* fue mayor en los ratones infectados con larvas provenientes de la zona centro que la sur, tanto en cerebro, canal como en riñón.
- Lo anterior podría indicarnos que estamos frente a una mayor patogenicidad de las larvas de *T. canis* provenientes de la zona central o una menor patogenicidad de las larvas del sur.
- Se detectó un polipéptido alrededor de 14 kDa Ig G reactivo, reconocido en forma específica por todos los sueros de los animales infectados, independiente del origen del parásito o el tiempo de infección. Por ende no se pudo establecer un reconocimiento antigénico que diferenciara a las larvas de *T. canis* obtenidas de las tres zonas del país.
- Sería importante relacionar estos resultados con la casuística de toxocarosis humana en el país y realizar más estudios que permitirían perfeccionar técnicas diagnósticas para la toxocarosis humana.

## BIBLIOGRAFIA

- ATIAS, A. 1999. Parasitología Médica. Publicaciones Mediterráneo. 333-337.
- ABO-SHEDA, M., HERBERT, I., 1989. Variations in innate resistance to experimental *T. Canis* infection in two strains of mice. *Parasitol.* 33: 297-307.
- ALCAINO H., TAGLE I., 1970. Estudios de enteroparasitosis del perro en Santiago. *Bol Chile Parasit* 25: 5-8.
- AMY, S., FOX, K., KASAEIS N., GOULD, S., CHINNAMMA, T. BOYER, K.M. 1985. Fatal eosinofilic meningoencefalitis and visceral larva migrans caused the *Raccon* ascarid. *Engl Med* 312: 1619-1623.
- BARRIGA, O. 1989. Inmunología de las infecciones parasitarias. *Parasitología Clínica*, Ed. Antonio Atias, 1999. Ediciones Mediterráneo. Pags. 66-101.
- BARRIGA, O.; MYSER, W. 1987. Effect of irradiation on the biology of the infective larvae of *T. canis* in the mouse. *J. Parasitol.* 73: 89-94.
- BEAVER, P.C., SYNDER, C.H., CARRERA, C.M., 1952. Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans: Report of three Cases. *Pediatrics* 9: 7.
- BRADFORD, M.; 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgrew quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- BURKE, J., 1977 Visceral larva migrans (toxocariasis). *J. Ky Med Assoc.* 75: 6770.
- CASTILLO, D.; PAREDES, C.; ZAÑARTU, C; CASTILLO, G.; 2000. Environmental contamination with *Toxocara* sp. eggs in publics squares and parks from Santiago, Chile. *Bol. Chil. Parasitol.* 55: 86-91.
- CONCEPCION, J.E., BARRIGA, O., 1985. Transfer of infections-induced immune protection to *T. canis* in a mouse model. *Vet. Immunol.* 9: 371-382.
- CORDERO, M.; ROJO, F. 1999. *Parasitología Veterinaria*. Mc Graw-Hill interamericana. España. 636-642.
- CUELLAR, C., FENOY, S., AGUILA, C., GUILLEN, J.L., 2001. Isotype specific immune responses in murine experimental txocariasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 96: 549-553.
- CYPESS, R.H., 1978. Visceral larva migrans. *Corbell Vet.* 68: 823.
- DANT, J.F., NICHOLS, R.L., BEAVER, P.C., 1956. Visceral larva migrans. *Am J Pathol* 32: 777-803.

- DUBLIN, S., SEAGAL, S., MARTINDALE, J., 1975. Contamination of soil in two city parks with canine nematode ova including *T. canis*. Am J Pub Hlth 65: 1242.
- EPE, C., SABEL, T., SCHNEIDER, T., STOYE, M., 1994. The behavior and pathogenicity of *T. canis* larvae in mice of different strains. Parasitol. Res. 80: 691-695.
- FANNING, M., HILL, A., LANGER, H.M., KEYSTONE, J.S., 1981. Visceral larva migrans (Toxocariasis) in Toronto. Can. Med. Assoc J. 124: 21-26.
- FAN, C.K.; CHUNG, W.C.; SU, K.E.; TSAI, I.J. 1998. Larval Distribution in different organs of ICR strain mice infected with *Toxocara canis*. Kaohsiung J. Med. Sci. 14: 315-20.
- FIEDMAN, S.; HENADA, A.R. 1960. Severe myocarditis with recovery in a child with visceral larva migrans. J. Pediatr. 56: 9.
- GEORGI, J.R., GEORGI, M.E., PARASITOLOGIA VETERINARIA Interamericana-Mc Graw-Hill 1994 México Págs. 171-178.
- GUILLEN, J.L.; BARDON, R; DOMINGUEZ, P.; CUELLAR, C. 1990. Migración larvaria de *T. canis* y respuesta eosinofílica en las cepas murinas BALB/c y C57BL/10. Rev Iber Parasitol 50: 289-299.
- HERSKOVIC, P., ASTORGA, B.; 1985. Toxocariasis humana en Chile. Rev. Med. Chile. 113: 18-21.
- HERSKOVIC, P., LEIVA, S., ASTORGA, B., MAZOUKA, E.E., CEPEDA, V., 1986. Toxocariasis humana en Chile. Evaluación del diagnóstico mediante ELISA. Parasitol al Día 10: 76-80.
- HUMBER, P., NIEZBORALA, M., SALEMBIER, R., AUBIN, F., 2000. Skin manifestation associated with toxocariasis: a case-control study. Dermatology. 201: 230-234.
- KAYES, S.G; OAKS, J.A. 1976. Effect of inoculum size and length of infection on the distribution of *Toxocara canis* larvae in the mouse. Am J Trop Med Hyg. 573-580.
- LOUKAS, A.; DOEDENS, A.; HINTZ, M.; MAIZAELS, R.M. 2000a. Identification of a new C-type lectin, TES, secreted by infective larvae of *T. canis*, which binds to host ligands. Parasitology 5: 545-554.
- LOUKAS, A.; HINTZ, M.; LINDER, D.; MULLIN, N.P.; PARKINSON, J.; TETTEH, K.K.; MAIZELS, R.M. 2000b. A family of secreted mucins from the parasitic nematode *T. canis* bears diverse mucin domains but shares similar flanking six-cysteine repeat motifs. J. Biol. Chem. 275: 39600-39607.
- MAGNAVAL, I.F. 1987 Elements nouveaux dans la sémiologie des larva migrans viscéralis. Presse Med 16: 151-154.

- MAGNAVAL, I.F., MICHAULT, N.I, CALONE N., CHARLET, I.P., 1994. Epidemiology of human toxocariasis in La Reunion. *Trans Roy Soc Trop med Hyg.* 88: 531-533.
- MARMOR, M., LAWRENCE, G.; SHOFER, F.; FICH, L.; ROSENBERG, C. CORNBLATT, B.; FRIEDMAN, S. 1987. *Toxocara canis* infection of childrens. Epidemiologic and neutrophychologic finding. *A.I.P.H.* 77: 554-559.
- MOK, C.H., 1968. Visceral larva migrans: a discussion based on review of the literature. *Clin Pediatr* 7: 565-573.
- NOEMÍ I.; RUGIERO, E. 1999. Larvas migrantes. In *Parasitología Clínica*, Ed. Antonio Atias, 1999. Ediciones Mediterraneo. 332-337.
- NOEMI, I.,SCHUH, W., HERSKOVIC, P., RIOS, E., 1984. Larva migrans en niños. *Rev Chile Ped* 55: 244-247.
- NEWMAN, C., 1978 Toxocariasis. *Develop Med Child Neurol* 20: 218-226.
- OBERG, C., FRANJOLA, K., LEYAN, V., 1979. Helmintos del perro domestico, *canis familiaris* en la ciudad de Valdivia. *Bol Chile Parasit* 34: 21-26.
- PARSONS, J.C., GRIVE, R.B, 1990. Effect of egg dosage and host genotype on the liver trapping in murine larval toxocariasis. *J. Parasitol.* 76: 53-58.
- RASMUSSEN, L.M.; DIRDAL, M.; BIRKELAEK, N.H. 1993. Covert toxocariasis in a child, treated with low dose diethylcarbamazine. *Acta Pediatr. (Norway)* 82: 116-118.
- ROCKEY, J.H.; DONNELLY, J.; STROMBERG, E.; SOULSBY; E.L. 1979. Immunopathology of toxocara canis and *Ascaris suum* infections of the eye: the role of the eosinophil. *Invest. Ophthamol. visual sci.* 1172-1184.
- SALINAS, P., REYES, L., SOTOMAYOR, L.T., LETONJA, T., 1987. Prevalencia de huevos de *Toxocara* sp. en algunas plazas públicas de la Región Metropolitana de Santiago. *Bol Chil Parasitol* 42: 33-36.
- SCHANTZ P.M. MEYER, D.; GLICKMAN, L. 1979. Clinical serological and epidemiological characteristics of ocular toxocariasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29: 24-28.
- SCHANTZ P.M., GLICKMAN, L., 1978. Toxocaral visceral larva migrans. *N England J Med* 298: 436-439.
- SMITH, M., BEAVER, P.C. 1953. persistence and distribution of *Toxocara* larva in the tissues of childrens and mice. *Pediatrics* 12: 491-496.
- SNYDER, C.H., 1961. Visceral larva migrans. Ten years experience. *Pediatric* 28: 85-91.
- STILES, T.J. 1963. Incidence of *Toxocara canis* and others helminth parasites of dogs in Mexico City. *J Parasitol* 53: 822.

URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.W., 2001. Parasitología veterinaria. Acribia. España. 636-640.

WORLEY, G.; GREEN, J.A.; TROTHINGHAM, J.E.; STURNER, R.; WALLS, K.; PAKANIS, V.A.; ELLISY, G.E. 1984. *Toxocara canis* infection: clinical and epidemiological associations with seropositivity in kindergarten children. J. Infect. Dis 149: 591-597.

WORLEY, D.E. 1964. Helminth parasites of dogs in southeastern Michigan. J Am Vet Med Assoc 144: 42.