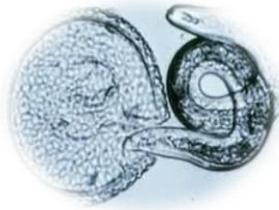


Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”

Laboratorio Nacional de Referencia de Zoonosis

Tesis para optar por el título de Máster en Parasitología



Cinética de antígenos circulantes y de anticuerpos específicos en la toxocariasis murina experimental

Autora: Lic. Dianeya Mendoza Llanes



La Habana, 2018

Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”
Laboratorio Nacional de Referencia de Zoonosis

Tesis para optar por el título de Máster en Parasitología

**Cinética de antígenos circulantes y de anticuerpos específicos en la toxocariasis
murina experimental**

Autora: Lic. Dianeya Mendoza Llanes

Tutores: Dra. Lázara Rojas Rivera, Dr. C.

Lic. Idalia Sariego Ramos, MSc.

Asesoras: Dra. Virginia Capó de Paz, Dr. Cs.

Dra. Jennys Peraza Borda

La Habana, 2018

RESUMEN

La detección de la infección por *Toxocara* spp. en el humano es compleja, en el cuerpo humano las larvas del parásito no se desarrollan, ni se multiplican. La demostración de antígenos circulantes en el suero humano se ha sugerido como una opción que pudiera mejorar la detección. Como parte del desarrollo de un nuevo ELISA sándwich basado en nanocuerpos, capaz de reconocer antígenos del parásito, es necesario estudiar la cinética de excreción-secreción de los antígenos diana en el suero. En este trabajo se usaron ratones BALB/c como modelo experimental. Se administraron huevos embrionados por vía oral o larvas por vía intraperitoneal a los ratones y se sangraron periódicamente. Se usaron dos inmunoensayos para capturar los antígenos circulantes y para detectar inmunoglobulinas IgG, respectivamente. A los 45 días se determinó la carga larval y se estudiaron los cambios histopatológicos. El cerebro fue el órgano con mayor carga larval ($P < 0,05$). Se encontró asociación entre la carga larval por animal y el tamaño del inóculo ($P < 0,05$). El principal cambio histopatológico encontrado fue la presencia de infiltrado inflamatorio crónico a ligero predominio de linfocitos. Los niveles séricos de antígenos circulantes se incrementaron paulatinamente a partir del tercer día pos infección, lo que coincidió con el incremento de la producción de IgG contra estos antígenos. Se encontró relación entre los niveles de antígenos de excreción-secreción larvales circulantes en el suero y el tamaño del inóculo. Se demostró que el nuevo ELISA utilizado detectó los antígenos circulantes del parásito en animales infectados con dosis bajas del parásito.

ÍNDICE

ACÁPITES	PÁGINA
1. Introducción.....	- 1 -
1.1. Objetivos.....	- 4 -
1.1.1. Objetivo general.....	- 4 -
1.1.2. Objetivos específicos.....	- 4 -
2. Información previa.....	- 5 -
2.1. Taxonomía.....	- 5 -
2.2. Características morfológicas.....	- 6 -
2.2.1. Huevos.....	- 6 -
2.2.2. Larvas.....	- 6 -
2.2.3. Adultos.....	- 7 -
2.3. Ciclo de vida.....	- 7 -
2.4. Patogenia.....	- 9 -
2.5. Manifestaciones clínicas.....	- 10 -
2.6. Detección.....	- 12 -
2.6.1. Estudios imagenológicos.....	- 12 -
2.6.2. Recuento o conteo del número de eosinófilos en sangre.....	- 12 -
2.6.3. Determinación de los niveles de IgE total o específica en suero de pacientes.....	- 13 -
2.6.4. Estudios serológicos.....	- 13 -
2.6.5. Uso de la biología molecular.....	- 17 -
2.7. Tratamiento.....	- 17 -
2.8. Epidemiología.....	- 18 -
3. Metodología.....	- 22 -
3.1. Obtención de huevos de <i>T. canis</i> y desarrollo de la embriogénesis.....	- 22 -
3.2. Obtención de larvas de <i>T. canis</i> y de los antígenos de excreción-secreción.....	- 22 -
3.3. Animales de experimentación.....	- 23 -
3.4. Infección de los ratones con huevos embrionados o con larvas de <i>T. canis</i>	- 23 -
3.5. Monitoreo de los animales de experimentación.....	- 24 -
3.6. Inmunoensayos.....	- 25 -

3.6.1. ELISA indirecto para la detección de anticuerpos IgG murinos anti- <i>Toxocara</i>	- 25 -
3.6.2. ELISA sándwich basado en nanocuerpos para detectar antígenos circulantes de <i>T. canis</i> ..	- 26 -
3.7. Conteo de larvas en órganos de los animales infectados y estudios histopatológicos.....	- 27 -
3.8. Análisis estadístico	- 28 -
3.9. Consideraciones éticas.....	- 28 -
4. Resultados	- 29 -
5. Discusión.....	- 38 -
6. Conclusiones	- 50 -
Recomendaciones.....	- 51 -
Bibliografía.....	- 52 -

1. Introducción

La toxocariasis se ha reconocido como una de las zoonosis de mayor transmisión en el mundo, fundamentalmente en países en desarrollo (Schantz, 2006). Los perros y los gatos son los hospederos definitivos de los agentes causales *Toxocara canis* y *Toxocara cati*, respectivamente (Despommier, 2003).

Los huevos son expulsados con las heces por los hospederos definitivos y embrionan en el medio ambiente hasta hacerse infectantes (larvados). La infección en el hombre se produce de manera accidental por ingestión de huevos embrionados (Botero y Restrepo, 2003). La transmisión por contacto directo con perros infectados es menos probable, debido al tiempo que necesitan los huevos para embrionar (entre 2 y 5 semanas) (Holland y col, 1991).

Entre los factores que favorecen la toxocariasis humana (TH) se encuentran la alta prevalencia de *T. canis* en perros y la gran cantidad de huevos diseminados por los perros parasitados (Serrano y col, 2000). El riesgo de infección es mayor en niños de 1 a 4 años de edad por sus hábitos de jugar e ingerir tierra, que puede estar contaminada con huevos de *Toxocara* spp. (Alonso y col, 2001).

Varios autores han planteado que la TH transcurre de forma asintomática en la mayoría de los casos (Taylor y col, 1988). Las altas cifras de seropositividad contrastan con la menor ocurrencia de cuadros severos, aunque estos últimos pueden producirse en dependencia de la carga parasitaria, por los sitios de migración larvaria y por la respuesta inflamatoria del hospedero (Glickman y Magnaval, 1993). Los dos síndromes principales que se producen en el humano son Larva Migrans Visceral (LMV), causada por la migración de las larvas a través de los órganos principales como el hígado y los pulmones y Larva Migrans Ocular (LMO) causada por la migración a través de las estructuras de los ojos (Smith y col, 2009).

En nuestro país se desconocen con exactitud las cifras de prevalencia. Una revisión sistemática de la literatura sobre el tema evidenció que *T. canis* es un parásito que puede ser comúnmente encontrado (Sariego y col, 2012). Por ejemplo, fue demostrada la presencia del parásito tanto

en perros callejeros como en perros domésticos y de huevos embrionados en áreas públicas de La Habana (Duménigo y col, 1994; Laird y col, 2000; Hernández-Merlo y col, 2007). Por otro lado, varios casos de LMV han sido reportados, y aunque en muchos de ellos no fue posible identificar la especie de la larva presente en el material biopsiado, no podemos descartar que algunos pudieran ser debido a *T. canis* (Fernández-Brito y col, 1974). Un estudio más reciente realizado en niños en edad escolar, en dos municipios de las provincias Pinar del Río y Sancti Spíritus, confirmó la exposición humana, demostrándose 39% de seropositividad (Sariago y col, 2012).

La detección de la infección por *Toxocara* spp. en el humano se basa fundamentalmente en la detección de anticuerpos específicos contra los antígenos de excreción-secreción larvales (TES), teniendo la limitante de no discriminar entre infección pasada y reciente. La demostración de la presencia de antígenos circulantes se ha sugerido como una opción que pudiera mejorar la detección, aunque la especificidad del anticuerpo de captura y el requerimiento de detectar antígenos que resultan de la disociación de los inmunocomplejos, limitan su aplicación (Smith y col, 2009).

Con la finalidad de mejorar la detección de la TH se están desarrollando investigaciones conjuntas entre el Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK), el Instituto de Medicina Tropical de Amberes y la Universidad Libre de Bruselas, Bélgica. De esta manera se ha optimizado un sándwich ELISA, basado en el uso de nanocuerpos, para la detección de antígenos circulantes en el suero humano, que posee gran especificidad y sensibilidad del sistema (datos no publicados).

Como parte del desarrollo del ensayo se hace necesario estudiar la dinámica de excreción de antígenos en suero en contraste con la producción de anticuerpos específicos, utilizando ratones BALB/c como modelo experimental. Esto permitiría conocer cuánto perdura la circulación de los antígenos diana y correlacionarlo con el estadio de la infección y con la carga parasitaria.

Entre los modelos animales usados para el estudio de la TH se encuentran las cepas de ratones (consanguíneas o no). Actualmente se considera que la cepa de ratones BALB/c es la indicada si se requiere estudiar la distribución de las larvas después de la infección (Holland y Hamilton, 2006). Se ha planteado que cuando las larvas abandonan el pulmón, entran en la circulación sistémica desde donde alcanzan los músculos esqueléticos y el sistema nervioso central. De esta manera, las larvas tienden a acumularse en el tejido cerebral donde pueden permanecer vivas, lo que puede resultar en cambios de comportamiento del animal (Summer y col, 1983; Holland y Cox, 2001). Con el tiempo las larvas parecen iniciar nuevamente la migración para redistribuirse por el cuerpo del hospedero (Othman, 2012).

El modelo también ha sido utilizado para constatar la presencia de antígenos de excreción-secreción larvales en suero y para estudiar la cinética de los anticuerpos que se producen contra estos antígenos (Robertson y col, 1988). En ese caso se demostró la naturaleza transitoria de la circulación de antígenos parasitarios reconocidos en un inmunoensayo desarrollado y se sugirió que esto pudiera ser el resultado de la formación de inmunocomplejos a medida que se desarrolla la respuesta inmune.

Sin embargo, el modelo murino no está exento de contradicciones, como por ejemplo: el uso de inóculos de huevos embrionados que no se corresponden con las dosis de infección esperadas en humanos, que se suponen sufren más comúnmente infecciones repetidas con inóculos menores. No obstante, en varios estudios los ratones BALB/c han resultado el modelo apropiado para la toxocariasis (Hamilton y col, 2006; Pinelli y col, 2007; Ollero y col, 2008). Basado en estos antecedentes y para demostrar la circulación de los antígenos que se reconocen mediante el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) sándwich basado en nanocuerpos, nos proponemos infectar ratones BALB/c con *T. canis*. En ausencia de una prueba confirmatoria para demostrar la infección en el humano, el uso del modelo animal nos permitirá una aproximación al fenómeno. No solo se podrá confirmar la presencia de anticuerpos específicos contra los TES en el suero de los animales infectados, sino que se podrá demostrar la presencia de larvas del parásito en los tejidos y órganos.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general

Caracterizar la cinética de antígenos de excreción-secreción larvales y de los anticuerpos específicos en suero, durante la infección experimental de ratones BALB/c con *T. canis*.

1.1.2. Objetivos específicos

- Determinar la carga larval en hígado, pulmones y cerebro de ratones BALB/c infectados experimentalmente con huevos embrionados o larvas de *T. canis*.
- Describir los principales cambios histológicos que se producen en hígado, pulmones y cerebro de ratones como consecuencia de la infección por *T. canis*.
- Describir la cinética de antígenos de excreción-secreción larvales/anticuerpos IgG específicos en suero durante la infección murina experimental.

2. Información previa

2.1. Taxonomía

Los nematodos del Orden Ascaridida han sido objeto de muchas investigaciones taxonómicas y filogenéticas. En el orden se han descrito más de 50 especies que se distribuyen en varios géneros (Nadler y Hudspeth, 2000). El género *Toxocara* se destaca porque algunas de las especies que lo integran provocan enfermedades que son transmitidas de los animales al hombre.

Las especies que conforman el género *Toxocara* pueden ser distinguidas entre sí según la morfología de los labios, las aletas cervicales, la longitud de las espículas y las características del aparato reproductor femenino. Entre las especies que pertenecen a este género se encuentran: *T. canis* (infecta cánidos); *T. cati* (infecta felinos); *T. vitulorum* (infecta bovinos); *T. pteropodis* (infecta murciélagos frugívoros); *T. tanuki*, *T. alienata* y *T. mackerrasae* (infectan roedores y otros animales silvestres); *T. malaysiensis* (infecta a los gatos domésticos) y *T. lyncis* (infecta caracoles), entre otras (Skrjabin y col, 1991; Gibbons y col, 2001; Borecka y col, 2010).

Entre las especies mencionadas anteriormente se destaca *T. canis* que se reconoce como el principal agente causal de la TH, por lo que a continuación se revisarán aspectos de su biología, de la clínica y de la epidemiología, entre otros.

La clasificación taxonómica de *T. canis* se muestra a continuación:

Dominio: Eukaryota

Reino: Animalia

Subreino: Bilateria

Rama: Protostomia

Infrareino: Ecdysozoa

Superphylum: Aschelminthes

Phylum: Nematelminthes

Clase: Secernentea

Subclase: Rhabditia

Orden: Ascaridida

Suborden: Ascaridina

Superfamilia: Ascaridoidea

Familia: Toxocaridae

Género: *Toxocara*

Especie: *canis*

2.2. Características morfológicas

El parásito *T. canis* se presenta en forma de huevo o larva (ambas de tamaño microscópico) o en forma de adulto que puede llegar a medir varios centímetros de longitud (Figura 1). A continuación se describen brevemente algunas características de estas formas parasitarias.



Figura 1. Formas del parásito *Toxocara canis*. A: huevos (400X), B: larvas (200X), C: adultos. Fuente: Laboratorio de zoonosis, IPK.

2.2.1. Huevos

Los huevos son esféricos, de color marrón oscuro, con cubierta externa gruesa e irregular que presenta un sistema reticular superficial de cresta y nervaduras (Naidu, 1981). Miden aproximadamente 85 μm de diámetro y son subglobulosos. El protoplasma se aprecia con un aspecto granuloso y no están embrionados cuando salen en las heces de los hospederos definitivos (Durette-Desset y Chabaud, 1974).

2.2.2. Larvas

Las larvas de *T. canis* miden aproximadamente 400 μm de longitud por 15-21 μm de diámetro. En el medio externo siempre se encuentran en el interior de los huevos (Macchioni, 1999; Nadler y Hudspeth, 2000; Gibbons y col, 2001). Dentro del huevo, el parásito realiza dos mudas (L1-L2, L2-L3) (Bruñaská y col, 1995).

2.2.3. Adultos

Los machos miden de 9 a 13 cm de largo y de 0,2 a 0,25 cm de ancho, mientras que las hembras, de 10 a 18 cm de largo y de 0,25 a 0,3 cm de ancho. En la región anterior presentan una boca provista con tres labios bien desarrollados y aletas cervicales, que son mucho más largas que anchas y miden entre 2 y 4 mm de largo por 0,2 mm de ancho. El esófago alcanza alrededor de 5 mm de largo incluyendo el ventrículo, el cual mide 0,5 mm de longitud. En la hembra, la vulva se encuentra situada entre la quinta y sexta partes anteriores del cuerpo del verme (Gillespie, 1988; Nestor y col, 2000).

2.3. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. canis* es el más complejo de todos los nematodos. Este ciclo biológico involucra dos clases de hospedadores:

- **Definitivos:** perros y cánidos salvajes, incluidos: zorros, coyotes, lobos, chacales, hienas y dingos, en los que el parásito alcanza su madurez y se reproduce sexualmente.
- **Paraténicos:** son hospederos accidentales en los que el parásito no evoluciona, pero puede sobrevivir alojado en los tejidos. Esta clase comprende una gran variedad de mamíferos, incluidos los cerdos, las ovejas, los roedores, así como los pollos, las codornices, los primates no humanos y el hombre.

El ciclo comienza cuando el perro ingiere huevos embrionados que eclosionan y las larvas que emergen, penetran la pared del intestino (Figura 2). En el perro mayor de 5 semanas de edad las larvas migran hacia varios tejidos, donde se enquistan. Las larvas enquistadas pueden ser reactivadas durante la gestación y los cachorros ser infectados vía transplacentaria o transmamaria, desarrollándose los gusanos adultos tanto en la madre como en los cachorros. De esta manera los huevos infectantes son excretados tanto por el cachorro, como por la madre.

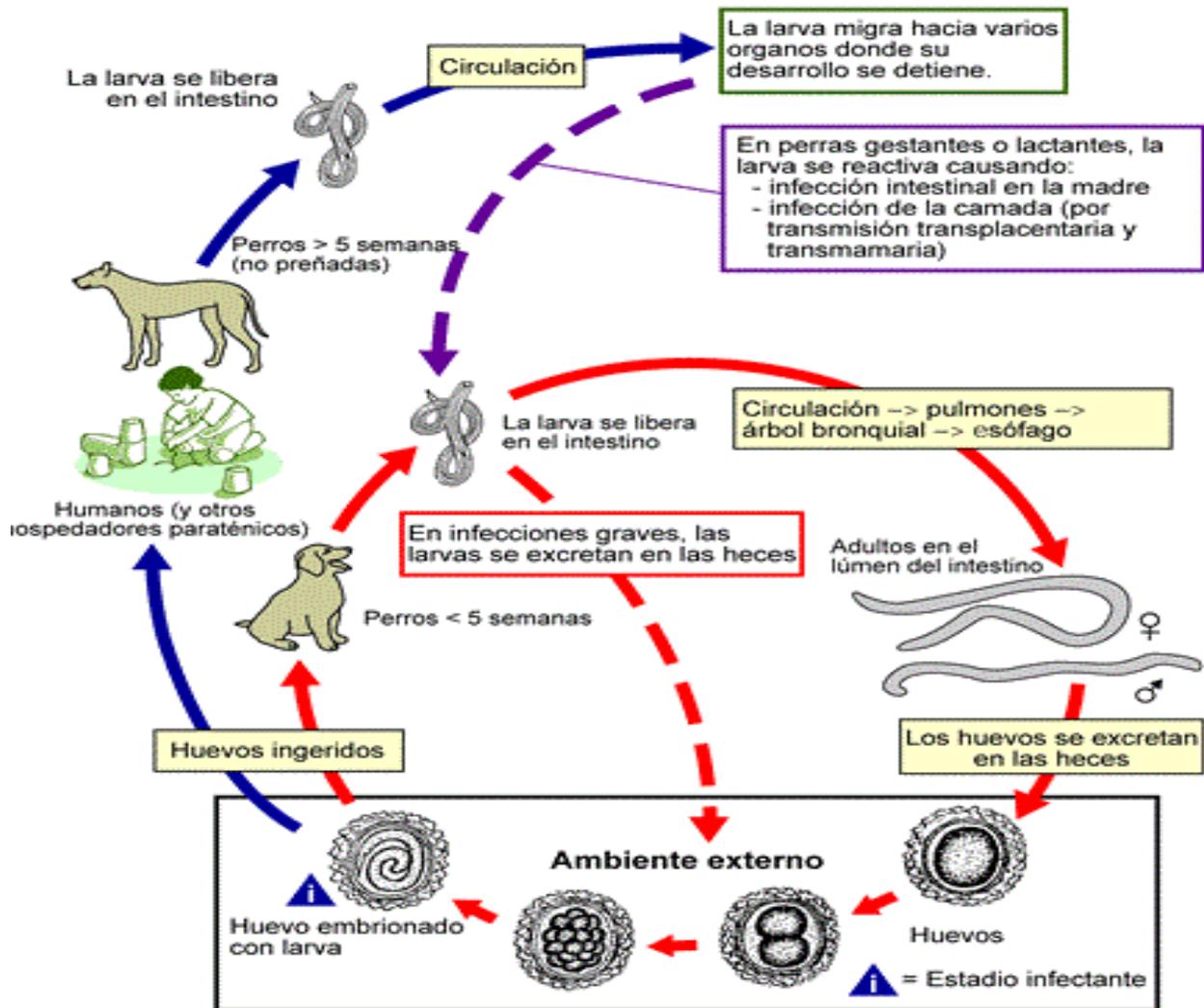


Figura 2. Ciclo biológico de *Toxocara canis*. Fuente: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>.

En perros más jóvenes, las larvas provenientes del hígado, atraviesan la pared intestinal y migran hasta los pulmones. De los pulmones pasan a la tráquea donde pueden ser expulsadas al exterior mediante tos o estornudos, o pueden llegar a la boca en cuyo caso son deglutidas. Esta migración dura aproximadamente 10 días. Una vez deglutida, la larva llega hasta el intestino donde muda y luego se desarrolla el estadio adulto, habrán transcurrido en total 25 a 30 días desde la infección. El macho y la hembra copulan, esta última pone huevos que salen con las heces del hospedero (Nichols, 1956).

En los humanos, después de la ingestión, los huevos eclosionan y las larvas que emergen penetran la pared intestinal y migran por vía circulatoria a vísceras y tejidos internos del cuerpo (hígado, corazón, pulmones, cerebro, músculos y ojos, fundamentalmente). En estos órganos el contacto del parásito con el sistema inmune desencadena una reacción granulomatosa que puede destruir al parásito o bloquear su migración al quedar encapsulados y permanecer en estado de hipobiosis. En ocasiones, ante estímulos que aún no han sido identificados, las larvas hipobióticas pueden reactivarse para reiniciar la migración, pero nunca se desarrollan, ni se multiplican.

2.4. Patogenia

Las larvas causan efectos patogénicos como resultado de la respuesta inflamatoria del hospedero y de la formación de granulomas. Los mecanismos responsables de la patogenia no han sido dilucidados (Ma y col, 2018). Las migraciones larvales provocan daños, que ocurren fundamentalmente en aquellos órganos o tejidos donde las larvas se asientan finalmente. La eliminación de mudas y líquidos de mudas (según proceda) y de otras secreciones o excreciones causan lesión, seguida de una respuesta inflamatoria granulomatosa particularmente en hígado, pulmón y ganglios. Las larvas migrantes dejan a su paso pequeños trayectos de tejido necrótico. El parásito se dispone en el centro del granuloma, intacto o destruido, rodeado por eosinófilos y macrófagos. En la periferia del granuloma se pueden encontrar histiocitos grandes, dispuestos en empalizadas y fibras colágenas concéntricas envolviendo a las células inflamatorias, las que posteriormente, se calcifican. En el ojo, las lesiones granulomatosas se presentan en la parte posterior, además de que pueden ocurrir: desprendimiento de retina, opacificación del humor vítreo y tumor fibrótico con compromiso visual parcial, entre otras complicaciones.

En el cerebro, las huellas de la migración de las larvas de *Toxocara* por lo general comprenden pequeñas áreas de necrosis y una mínima infiltración inflamatoria (Hotez, 1993). Según la localización, las larvas actúan como focos irritativos que pueden desencadenar un importante compromiso neurológico. Recientemente los estudios han sugerido que la patología observada

en este órgano se debe más a los mecanismos mediados por la inmunidad y al trauma ocasionado por las larvas migrantes, que a efectos citotóxicos agudos (Heuer y col, 2015).

Además debido a la migración de las larvas se desarrollan lesiones mecánicas y obstructivas en pulmones y en el hígado, pudiendo ser manifiestas (Lloyd, 1993). Las larvas también ejercen acción expoliatriz, hematófaga e histófaga.

2.5. Manifestaciones clínicas

Las formas clínicas en la TH varía ampliamente y comprende desde casos asintomáticos, hasta síndromes de gran severidad (Pawloski, 2001; Chen y col, 2018). Una gran proporción de infecciones por *Toxocara* transcurre de forma asintomática, o cursa con síntomas inespecíficos. Entre los factores que determinan la severidad de la presentación clínica se encuentran: el tamaño del inóculo determinado por el número de huevos larvados ingeridos, la edad del hospedero, la intensidad de la respuesta inmune que desarrolla y los órganos donde se asientan las larvas. La presentación clínica de la toxocariasis en humanos incluye LMV, LMO, toxocariasis neurológica (TN) y toxocariasis encubierta (TE), que a continuación se describen brevemente.

LMV: El cuadro clínico del síndrome de LMV es severo causado por la migración larvaria. Sus principales manifestaciones son: anorexia, náuseas, vómitos, dolor abdominal, fiebre alta, urticaria, eritema y artralgias. También pueden presentarse: tos, crisis asmátiforme, hepatoesplenomegalia y miocarditis, incluso con insuficiencia cardíaca. En piel se pueden observar diversas manifestaciones que comprenden desde urticaria hasta eczema generalizado. Las enzimas hepáticas se alteran levemente lo que puede reflejar daño hepático que se evidencia por la aparición de surcos subcapsulares al realizar el estudio laparoscópico. Se pueden evidenciar focos granulomatosos en la ecotomografía y en la resonancia magnética. Además, se presentan hipereosinofilia e hipergammaglobulinemia que cursan con serología reactiva para anticuerpos anti-*Toxocara*.

LMO: es la forma localizada de la toxocariasis más conocida en la literatura mundial (Pawlowski, 2001). En general, es más frecuente en general en niños mayores de 10 años y suele cursar sin la eosinofilia característica de las otras formas de toxocariasis (Schantz y Glickman, 1978). El parásito se localiza dentro del globo ocular y ocasiona con frecuencia uveítis y retinitis granulomatosa (Dernouchamps y col, 1990; Ahn y col, 2014). Esta entidad se confunde con otras etiologías, como es el caso del tumor maligno conocido como retinoblastoma (Despommier, 2003). También puede pasar casi desapercibida, debido a que el paciente solamente aqueja disminución progresiva de la agudeza visual (Minvielle y col, 1999; Magnaval y col, 2001). Algunos casos presentan dolor o hemorragias intraoculares debido al intenso proceso inflamatorio (Magnaval y col 2001; Despommier, 2003). También pueden producirse diversas secuelas tales como: la pigmentación simple de la retina, el surgimiento de una membrana epiretinal, que se produzcan defectos en la capa fibrosa del nervio retinal o que aparezca una escara macular (Ahn y col, 2014a; Ahn y col, 2014b).

TN: forma localizada que cobró importancia en la década de los 2000. Entidad clínica que resulta de la invasión del sistema nervioso central por larvas de *Toxocara* y comprende encefalitis, meningitis, mielitis, convulsiones epileptiformes, trastornos conductuales, hipostesias, paraparesias, vejiga neurógena espástica y hemiplejía (Finsterer y Auer, 2007; Sánchez y col, 2018). Además se ha sugerido la posible relación entre la NT y los desórdenes neurodegenerativos, por ejemplo: esquizofrenia, déficits cognocitivos, enfermedad de Parkinson idiopática y demencia (Çelik y col, 2013; Fan y col, 2015).

TE: se caracteriza por signos y síntomas inespecíficos que parecen depender de la respuesta inmunopatológica de algún órgano afectado. La expresión clínica es muy variable y puede presentarse como asma, bronquitis aguda o neumonitis con o sin síndrome de Loeffler (Felman y Parker, 1992; Buijs y van Knapen, 1994; Inoue y col, 2002); se pueden presentar además trastornos dermatológicos como urticaria crónica o eczema (Wolfrom y col, 1995), linfadenopatía, miositis y artralgia (Pawlowski, 2001, Walsh y col, 1988; Kraus y col, 1995).

2.6. Detección

La detección definitiva de la toxocariasis en seres humanos se logra con la identificación de las larvas migrantes en biopsias de los tejidos afectados, lo cual es un hecho casi excepcional (Magnaval y col, 2001; Pawlowski, 2001; Despommier, 2003; Smith y col, 2009). Debido a esto se plantea que existen cinco marcadores principales de la toxocariasis sintomática: las características de la historia epidemiológica del paciente, los signos y síntomas encontrados, la presencia de eosinofilia y de niveles incrementados de IgE total, así como un resultado positivo en la serología (Pawlowski, 2001; Smith y col, 2009).

2.6.1. Estudios imagenológicos

En el síndrome de LMV las técnicas de ultrasonido de alta resolución pueden revelar áreas hipoecoicas en el hígado (Magnaval y col, 2001). En el caso de LMO es de gran importancia el uso de la angiografía fluoresceínica, el ultrasonido ocular y la tomografía axial computarizada (TAC), particularmente para diferenciar esta entidad del retinoblastoma (Cortez y col, 2010).

Estas técnicas se utilizan luego de que haya observado en la exploración del fondo de ojo una masa inflamatoria. En la angiografía fluoresceínica puede constatarse fuga del contraste tanto en la masa como a nivel papilar, además de edema macular, sin áreas de isquemia (Pérez-Salvador y col. 2011). Mediante ultrasonido el hallazgo más consistente con la TO es una masa retinal altamente reflectiva localizada en el polo posterior o periférico, que pudiera estar calcificado y que tiene como característica fundamental la adhesión a membranas del vítreo (Morais y col, 2012). En la tomografía de coherencia óptica se observa una masa altamente reflectiva rodeada de fluido subretinal, que protruye sobre el epitelio en el área macular (do Lago y col, 2006).

2.6.2. Recuento o conteo del número de eosinófilos en sangre

Este parámetro medido en sangre periférica es proporcional a la eosinofilia tisular. La eosinofilia ocurre en las etapas de migración tisular de las larvas que es la reacción local a las larvas de *Toxocara*, ya que los eosinófilos son el componente más abundante en el infiltrado celular o granuloma. Valores entre 400 y 1000x 10⁹ eosinófilos L⁻¹ son más frecuentes en casos

asintomáticos, en la TE y en el síndrome de LMV incompleto, mientras que valores superiores a 3000×10^9 eosinófilos L^{-1} son típicos de casos de LMV (Pawlowski, 2001)

2.6.3. Determinación de los niveles de IgE total o específica en suero de pacientes.

Los anticuerpos IgE producidos contra *Toxocara* están presentes en 54% de casos de toxocariasis en humanos y son altamente específicos. El nivel de anticuerpos IgE específicos contra *Toxocara* es mayor en pacientes sintomáticos (35%) que en asintomáticos (24%) (Pawlowski, 2001). En un estudio más reciente los pacientes con toxocariasis mostraron niveles elevados de IgE total a pesar de que la mayoría de los casos eran asintomáticos. Los niveles de IgE resultaron superiores a 1300 UI, lo cual fue similar a los niveles observados en un grupo de pacientes que tenía un síndrome hipereosinofílico sin causa atribuible (Sun-Young y col, 2018).

2.6.4. Estudios serológicos

Los anticuerpos específicos de tipo IgG constituyen el marcador más importante de infección por *Toxocara*, por lo que su detección es de utilidad para todo el espectro clínico de la toxocariasis (Magnaval y col, 2001; Despommier, 2003). Para ello, a lo largo de los años se han utilizado diferentes preparaciones antigénicas, desde antígenos totales que se han obtenido de la maceración de los adultos del parásito, hasta llegar a los antígenos de excreción-secreción larvales que aún se utilizan en nuestros días (Smithy Noordin, 2006; Elefant y col, 2016).

2.6.4.1. Ensayo inmunoenzimático ligado a enzima para detectar anticuerpos anti-*Toxocara*

En la actualidad estos ensayos utilizan los TES que liberan las larvas cuando se cultivan en un medio libre de proteínas. Los TES son una mezcla de productos antigénicos que se originan en los órganos secretorios del parásito (glándula esofágica y el poro secretor) y que en su mayoría son glicoproteínas. Estos productos se nombran según su peso molecular aparente en electroforesis en gel de poliacrilamida, por ejemplo: TES-120 y TES-32 (Holland y Smith, 2006). Algunos TES comparten epítopes con otros helmintos, por lo que pueden producir reacciones cruzadas cuando se usan en los inmunoensayos.

Para incrementar la especificidad de la prueba de ELISA para *Toxocara* se han utilizado fracciones de los TES o antígenos individuales, nativos o recombinantes (rTES). Entre los rTES que se han desarrollado se encuentra rTES-30, con el que se estandarizó un inmunoensayo con sensibilidad y especificidad excelentes (Yamasaki y col, 2000). También se desarrolló un ELISA altamente específico utilizando rTES-120 (uno de los componentes mayoritarios de los TES) (Fong y col, 2003). También se ha demostrado la utilidad de la combinación de tres rTES (rTES-26, rTES-30USM y rTES120) para la detección específica de anticuerpos de la subclase IgG4, que han demostrado tener mayor especificidad para la detección de la TH (Mohamad y col, 2009).

Varios autores recomiendan confirmar el resultado del estudio por ELISA haciendo uso de la inmunotransferencia o *Western blot* (del inglés). Esto es debido a que pueden producirse reacciones cruzadas con otros helmintos. Con esta técnica se puede evidenciar la presencia de un patrón de bandas característico, en el que las proteínas de bajo peso molecular son de gran importancia (Pawlowski, 2001; Smith y col, 2009).

En la actualidad se cuenta con varios estuches comerciales, que se han desarrollado para detectar anticuerpos IgG específicos anti-TES que se encuentran disponibles para el diagnóstico clínico y para estudios epidemiológicos. La especificidad y la sensibilidad de los inmunoensayos que se han desarrollado dependen tanto de los antígenos seleccionados, como del tipo de anticuerpos que son detectados (revisados por Ma y col, 2018).

2.6.4.2. Detección de antígenos circulantes

Algunos autores han señalado lo ventajoso que resultaría, para la detección de la TH, poder disponer de ensayos para detectar antígenos circulantes (Smith y col, 2009). Estos autores recomiendan continuar la investigación en este campo, aunque reconocen las limitaciones que se han confrontado como por ejemplo que es necesario desarrollar un anticuerpo de captura de gran especificidad así como eliminar el requerimiento de disociar inmunocomplejos con el fin de incrementar la posibilidad de detectar los antígenos, lo cual ha sido una característica común de todos los inmunoensayos desarrollados hasta la actualidad. Esto se debe

fundamentalmente a que las larvas se encuentran en los tejidos donde se presume que la carga parasitaria puede ser baja en la mayoría de las infecciones humanas (Smith y col, 2009).

A lo largo de los años solo unos pocos estudios se han conducido con el objetivo de desarrollar inmunoensayos para detectar antígenos circulantes de *Toxocara* en muestras clínicas. En el primero de ellos se desarrolló lo que los autores llamaron un "ensayo sándwich de dos sitios basado en un mismo anticuerpo monoclonal". Se trataba de un ELISA que usaba un anticuerpo monoclonal para la captura de los antígenos y luego ese mismo anticuerpo, conjugado con peroxidasa, se usaba para la detección. De esta manera se detectaron antígenos en el suero de pacientes ingleses diagnosticados con LMV o LMO y en cuatro niños asintomáticos de Papua Nueva Guinea (Robertson y col, 1988).

En otro estudio se desarrolló un ELISA sándwich cuyo límite de detección fue de 4 ng/mL y no mostró reactividad cruzada con antígenos de *Áscaris lumbricoides*, *A. suum* o *Dirofilaria immitis* (Katsutoshi y col, 2002). Ishiyama y colaboradores (2009) por su parte notificaron el desarrollo de un ELISA sándwich que usaba un anticuerpo monoclonal para capturar los antígenos y un anticuerpo policlonal, obtenido en conejo, para realizar la detección. Este ensayo también tenía un límite de detección de 4 ng/mL y fue capaz de detectar 4 de 9 muestras positivas, sin reactividad cruzada con antígenos de otros nematodos.

Llama la atención que al realizar una búsqueda en la literatura no se encontró referencia posterior de la validación e introducción de ninguno de estos inmunoensayos para la detección de la TH. Más recientemente, Rodríguez-Caballero y colaboradores (2015) publicaron el desarrollo de un ELISA sándwich que se basa en el uso de un anticuerpo policlonal para la captura de los antígenos y un anticuerpo monoclonal para la detección. Este ensayo tiene un límite de detección de 440 pg/mL y una sensibilidad de 31% en muestras clínicas, estos autores también demostraron que los antígenos reconocidos en este inmunoensayo circulan en el suero de ratones infectados experimentalmente con bajas dosis del parásito (Rodríguez-Caballero y col, 2017).

2.6.4.3. Desarrollo de un ELISA sándwich basado en el uso de nanocuerpos, para la detección de antígenos de *T. canis* circulantes en suero humano.

La plataforma tecnológica de Nanocuerpos®, se desarrolló luego que se descubriera accidentalmente un tipo especial de anticuerpos en el suero de los miembros de la familia Camelidae (camellos y llamas). Estos animales además de tener anticuerpos convencionales de tipo IgG, tienen otros que carecen de cadenas ligeras. Estos anticuerpos usan el dominio variable amino terminal de sus cadenas pesadas para interactuar con el determinante antigénico. El dominio variable de esos anticuerpos, se conoce con las siglas VHH (del inglés, *variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody*). Los VHH también se conocen con el nombre de nanocuerpos (Ncs) debido a sus dimensiones en la escala nanométrica, que es 4 x 2,5 x 3 nm (Huang y col, 2010).

Hoy en día se cuenta con métodos bien establecidos para producir genotecas de *vhh*, usando fagos o levaduras y para aislar los *vhs* antígeno-específico. Además, los Ncs pueden ser producidos fácilmente como proteínas recombinantes en bacterias y levaduras, parecen ser bastante solubles y robustos y no poseen tendencia a agregarse. Los Ncs muestran una alta afinidad por los antígenos diana y pueden ser fácilmente manipulados en su construcción para incrementar la sensibilidad de sistemas inmunoenzimáticos (Huang y col, 2010). Por estos motivos se consideró que los Ncs podrían constituir una buena alternativa para desarrollar un inmunoensayo para la detección de los antígenos de *T. canis* circulantes en el suero humano.

En consecuencia, se generaron Ncs contra los TES y se expresaron de manera recombinante en bacterias. Se descartaron aquellos que producían reacciones cruzadas con otros helmintos. Los Ncs así seleccionados, se modificaron genéticamente para obtenerlos bivalentes y biotinilados o conjugado con peroxidasa y se usaron para optimizar un ELISA sándwich que detecta TES en el rango de los picogramos en un sistema simulado con suero humano (datos no publicados). Este inmunoensayo se encuentra actualmente en fase de validación.

2.6.5. Uso de la biología molecular

En las últimas décadas se desarrollaron herramientas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa que permiten la identificación y diferenciación de las larvas de *Toxocara* spp. (Li y col, 2007; Borecka y Gawor, 2008). Hasta el momento el uso de estas herramientas se ha limitado a la detección de los parásitos en la infección experimental en modelos animales o en estudios epidemiológicos para la diferenciación de las especies que contaminan el suelo (Rai y col, 1997; Fogt-Wyrwas y col, 2007; Macuhova y col, 2010). Debido a que puede resultar difícil distinguir morfológicamente entre las larvas de *Toxocara*, particularmente cuando la larva, o solo partes de ella, se han recuperado de tejidos humanos, se considera que estas herramientas pudieran ser muy útiles para realizar la detección en estos casos (Chen y col, 2012). Sin embargo, en la literatura internacional son casi inexistentes los reportes de la detección de ADN del parásito en material procedente de biopsias practicadas a humanos.

2.7. Tratamiento.

La decisión de tratar las infecciones por *Toxocara* spp. es difícil. Algunos autores cuestionan la necesidad del tratamiento pues la toxocariasis a menudo transcurre de manera subclínica o puede autolimitarse (Mikulecky y Mikulecky, 1994; Magnaval y col, 2001). Otros autores han expresado preocupación por las posibles respuestas alérgicas que pueden surgir después de la terapia antihelmíntica. Estas respuestas pueden llegar a ser más graves que la enfermedad en sí (Takayanagiy col, 1999, Pawlowski, 2001). Sin embargo, la TH es una infección crónica, que puede persistir durante un tiempo largo y la reactivación de la migración de las larvas en el ojo o el cerebro pueden ocurrir en cualquier momento (Pawlowski, 2001; Wiśniewska-Ligier y col, 2012). Por lo tanto, el tratamiento específico se recomienda en casos de LMV y algunos casos de TE. El tratamiento de la TO y TN es una cuestión de juicio clínico y el tratamiento con antihelmínticos debe combinarse con antialérgicos. Por otra parte, algunos casos seropositivos, generalmente con títulos altos, sin ningún tipo de expresión clínica de toxocariasis pudieran requerir terapia específica para intentar disminuir el número de larvas hipobióticas o migratorias (Pawlowski, 2001; Magnaval y col, 2005).

El albendazol parece ser la droga tentativa de elección (Hotez, 1995; Caumes, 2003; Magnaval y col, 2005). El régimen recomendado es 10 mg/kg de peso, diarios durante 14 días (Hotez, 1995; Magnaval y col, 2005) o 15 mg/kg de peso, durante 5 días (Pawlowski, 2001). La absorción del albendazol se mejora por la ingesta de una comida rica en grasas. Este medicamento cruza la barrera hematoencefálica y generalmente es bien tolerado (Vidal y col, 2003). Otros medicamentos útiles pudieran ser dietilcarbamazina (Magnaval y col, 2005) y tiabendazol (Maguire y col, 1990).

Los corticosteroides son imprescindibles en el tratamiento con el fin de mitigar la respuesta inflamatoria. Esteroides, administrados tópicamente, originalmente como inyección periorcular de depósito, y/o sistémicamente, producen una mejora de consideración (Cortez y col, 2011). Los medicamentos antiinflamatorios más comúnmente usados son prednisona o prednisolona orales. El régimen habitual es aproximadamente 1 mg/kg diariamente durante 1 mes, luego la dosis es disminuida gradualmente (Magnaval y col, 2005).

2.8. Epidemiología

El estudio epidemiológico de la toxocariasis es complejo ya que se deben considerar tres eslabones: la enfermedad en los cánidos, la contaminación ambiental con el parásito y la TH, así como su interconexión. La toxocariasis tiene una distribución cosmopolita (Figura 3); se considera endémica en la mayor parte de los países de América, África y Asia y es de interés tanto veterinario como sanitario.

La TH tiende a ser más prevalente en las regiones tropicales que en las regiones templadas, y es más frecuente en las poblaciones rurales que en poblaciones urbanas en la misma región o país (Rubinsky y col, 2010).

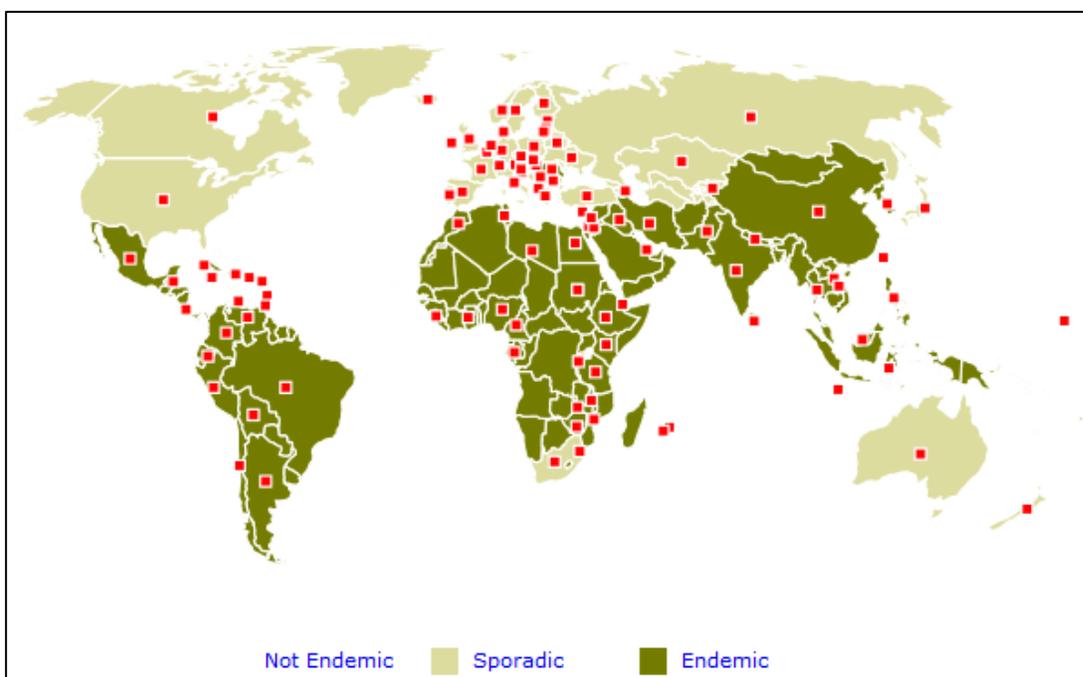


Figura 3. Distribución mundial de la toxocariasis. Fuente GIDEON, <http://www.gideononline.com/> (Consultado 2 de octubre de 2018).

Se describen dos vías fundamentales de infección para el humano:

1. Por la ingestión accidental de los huevos embrionados, por contacto con áreas de tierra que los contienen, tanto en parques públicos o jardines de hogares donde los animales hayan realizado deposiciones contaminadas con el parásito. Esta vía de infección es importante en niños y adolescentes, que por la actividad lúdica, tienen contacto más frecuente con estos lugares.
2. Por la ingestión de carne cruda procedente de hospederos paraténicos.

El estudio de la epidemiología de la TH sigue siendo problemático por varias razones. Entre ellas se destaca que gran parte de los datos con que se cuenta acerca de la epidemiología de la TH humana se basa en la determinación de anticuerpos IgG específicos contra TES, por lo que la comprensión de la relación entre la exposición y la enfermedad sigue siendo pobre (Smith y col, 2009).

Los valores de seroprevalencia encontrados en sujetos aparentemente sanos oscilan entre 2,4% en Dinamarca (se estudiaron 3247 sujetos menores de 40 años de edad) (Stensvold y col, 2009) a 92,8% en Isla Reunión (387 sujetos mayores de 15 años de edad) (Magnaval y col, 1994). En Europa se han encontrado prevalencias que varían desde 2,7% hasta 15,7% (89). Estudios realizados en Latinoamérica han encontrado prevalencias que varían entre 3,6% en Brasil, hasta 16,1% en Uruguay. En Colombia estudios que se han llevado a cabo en Bogotá y Medellín han hallado prevalencias hasta de 47,5% en la población general (Rubinsky y col, 2010).

El factor de riesgo más relacionado con la toxocariasis sintomática es la geofagia, que se presenta fundamentalmente en niños menores de 5 años. Los niños son el segmento poblacional más proclive a padecer la toxocariasis, por sus hábitos de juego vinculados a la tierra y a la arena y por la costumbre de llevar las manos sucias a la boca (Kroten y col, 2018). Además, otro factor de riesgo a considerar es el contacto directo con perros, ya que los huevos viables de *Toxocara* pueden permanecer adheridos en el pelaje (Overgaauw y col, 2009).

Los perros y gatos con infecciones patentes pueden transmitir la toxocariasis contaminando el ambiente con huevos. Los perros excretan grandes cantidades de huevos de *Toxocara*; incluso un perro infectado levemente excreta 10 000 huevos por cada gramo de heces. La mayor parte de la contaminación de la tierra se produce por cachorros. Entre un tercio y la mitad de las perras también excreta huevos de *T. canis* después de la parición.

La prevención de la toxocariasis puede lograrse mediante la puesta en práctica de las siguientes medidas: desparasitar regularmente a los perros, evitar la contaminación del suelo por heces de perro y gatos de las áreas adyacentes a las casas y en las áreas de juego de los niños, lavarse las manos después del juego con animales o en el suelo y antes de consumir alimentos, así como controlar la geofagia.

Otros factores a tener en cuenta para la prevención de la toxocariasis son: pasear a los perros con collar y correa en lugares públicos, para evitar que deambule; evitar que los perros ingieran

ratas, aves o carne cruda de animales salvajes, evitar que los niños sean lamidos en la boca por los perros y lavar muy bien los vegetales que son ingeridos de forma cruda.

Si bien la toxocariasis puede ser fácilmente prevenida, no existe adecuada concientización sobre el alcance del problema. Aunque la enfermedad puede ser significativa y debilitante, la incidencia de manifestaciones clínicas graves es desconocida y el diagnóstico es difícil. Esto pudiera conducir a una percepción falsa de que la carga parasitaria y el impacto de la toxocariasis en la salud pública son bajos. En consecuencia, algunos autores se han referido a la toxocariasis como una infección olvidada de la pobreza (Hotez y Wilkins, 2009).

3. Metodología

La investigación se desarrolló en el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, en el período de enero a abril de 2018. A continuación se describen los procedimientos.

3.1. Obtención de huevos de *T. canis* y desarrollo de la embriogénesis

Los adultos de *T. canis* se obtuvieron a partir de perros infectados naturalmente, procedentes del Centro de Observación Canina del Minsap, que se encuentra ubicado en el municipio La Lisa. Los parásitos hembras se disectaron para extraer el útero y coleccionar los huevos, que se mantuvieron en solución de H₂SO₄ (0,2 M) a temperatura ambiente, con luz artificial constante y con agitación manual breve en días alternos para facilitar la oxigenación, hasta que se observó la larva móvil en su interior. El desarrollo de la embriogénesis se inspeccionó periódicamente. Para ellos transcurridos los primeros 15 días de incubación, y durante cinco semanas, con periodicidad semanal, se determinó el porcentaje de huevos embrionados con respecto a la masa total de huevos. Para ello se usó la cámara de Neubauer y se promedió el resultado del conteo de huevos de cinco alícuotas de 20 µl cada una.

3.2. Obtención de larvas de *T. canis* y de los antígenos de excreción-secreción

Los huevos embrionados fueron tratados con hipoclorito de sodio a 14% durante 10 min a temperatura ambiente. En gabinete de seguridad, los huevos fueron lavados dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (pH 7) estéril mediante centrifugación a 3000xg y finalmente, con medio RPMI (que se suplementó con glutamina (2 mM), penicilina G sódica (100 IU/mL), sulfato de estreptomicina (100 µg/mL) y anfotericina B (1 µg/mL). Se provocó la eclosión de los huevos mediante homogenización manual con ayuda de un homogenizador tipo Potter. Posteriormente, la suspensión se transfirió a un aparato de Baermann y se recuperaron las larvas luego de tres horas de incubación a temperatura ambiente. Las larvas se mantuvieron a 37°C, a una concentración de 1000 larvas/mL, en medio RPMI que se suplementó con antibióticos. El medio de cultivo se cambió semanalmente.

Para obtener los TES, se colectó el sobrenadante del cultivo de las larvas, se suplementó con inhibidores de proteasas (Complete Mini, Roche Diagnostics GmbH, Germany), según las instrucciones del fabricante y se concentró mediante un sistema de ultrafiltración Amicón (membrana 3000 Da, Millipore). El concentrado se filtró (0,22 μm , Millipore) y se desalinizó mediante cromatografía de filtración en gel (PD10, Amersham Biosciences), para cuya elución se usó PBS diluido cuatro veces. Los TES se alicuotaron y se mantuvieron a -20°C hasta su uso posterior.

3.3. Animales de experimentación

Se utilizaron ratones BALB/c machos con peso entre 18 y 20g (8 semanas de nacidos) que se suministraron por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), con sus correspondientes certificados de salud. Setenta y dos horas antes de comenzar los experimentos, los animales se colocaron en cajas T3 en grupos de 10, con acceso libre al agua y a los alimentos bajo condiciones adecuadas (temperatura de 25°C , humedad de 70%), para facilitar su adaptación.

3.4. Infección de los ratones con huevos embrionados o con larvas de *T. canis*

La concentración de las suspensiones de parásitos, se determinó mediante conteo en cámara de Neubauer, en el caso de las larvas se inmovilizaron previamente con ayuda de PBS-formol 5%. En cada caso se promedió el conteo de cinco alícuotas de la suspensión (20 μL). La concentración de cada suspensión se ajustó para administrar a cada grupo de animales seleccionado aleatoriamente, la cantidad de parásitos correspondiente, suspendidos en 100 μL de salina fisiológica estéril. Dos grupos de animales solo recibieron solución salina por vía oral o por vía intraperitoneal y se usaron como control. Operativamente los grupos experimentales se nombraron como se muestra a continuación:

Grupo 1 (G1): se administraron 50 huevos embrionados por vía oral

Grupo 2 (G2): se administraron 100 huevos embrionados por vía oral

Grupo 3 (G3): se administraron 50 larvas por vía intraperitoneal

Grupo 4 (G4): se administraron 100 larvas por vía intraperitoneal

3.5. Monitoreo de los animales de experimentación

Los animales se identificaron individualmente mediante muescas en las orejas para facilitar el seguimiento. Se determinó el peso de cada uno los ratones y se les extrajeron 60 μ L de sangre del seno retro-orbital utilizando un tubo microcapilar no heparinizado. La sangre se procesó, mediante centrifugación a 500xg, para obtener el suero, que se conservó a -20°C hasta su utilización. Estos procedimientos se realizaron antes de la infección y se repitieron los días 3, 6, 9, 12, 15, 21, 30 y 45 pos infección.

La infección experimental y las extracciones periódicas de muestras de sangre como parte del monitoreo de los animales de experimentación podrían incrementar el estrés y el daño a los mismos. Por este motivo los ratones se sometieron a vigilancia periódica para en caso de ser necesario realizar acciones para disminuir el daño o aplicar punto final humanitario. Se confeccionó una ficha de observación donde aparece la relación de variables que se estudiaron y las acciones a emprender según la severidad del daño (Tabla 1).

Tabla1. Indicadores de bienestar que se evaluaron durante el seguimiento de los animales involucrados en los experimentos y acciones propuestas para reducir el sufrimiento.

Aspecto/Indicador	Puntuación	Acciones
Peso corporal		
Pérdida de peso hasta 10 %	1	Incrementar la frecuencia del seguimiento
Pérdida de peso de 10 % a 20 %	2	Consultar al veterinario
Pérdida de peso superior a 20 %	3	Adoptar punto final humanitario (PFH)
Acicalamiento		
Ligeramente descuidado	1	Incrementar la frecuencia del seguimiento, consultar al veterinario
Falta de acicalamiento	2	PFH

Locomoción		
Postura/locomoción ligeramente Anormales	1	Incrementar la frecuencia del seguimiento
Postura/locomoción muy anormales	2	Consultar al veterinario
Inmovilidad	3	PFH
Respiración		
Taquipnea (respiración rápida)	1	incrementar la frecuencia del seguimiento, consultar al veterinario
Disnea (dificultad para respirar)	2	PFH
Convulsiones		
No se observan	1	
Se observan	2	PFH

3.6. Inmunoensayos

Las muestras de suero de los ratones, se ensayaron por duplicado mediante inmunoensayos de tipo ELISA para detectar tanto antígenos como anticuerpos. Para la detección de anticuerpos específicos contra los antígenos de excreción-secreción larvales, se utilizó un ELISA indirecto y para la determinación de los antígenos circulantes, un ELISA sándwich que se basa en el uso de nanocuerpos.

3.6.1. ELISA indirecto para la detección de anticuerpos IgG murinos anti-*Toxocara*

Para la detección de anticuerpos específicos contra los TES, a cada pozo de una placa de microtitulación (NUNC-Maxisorp, Thermo scientific, Alemania) que se sensibilizó previamente con TES diluido (5 µg/mL) en tampón de recubrimiento (tampón carbonato; 0,05 M; pH 9,6) y se bloqueó con leche descremada (2,5%) en PBS-Tween 20 (0,05%), se le añadieron 100 µl de la muestra de suero (1/500 en PBS-Tween 20). Luego de incubación durante 1h a 37°C y tres lavados con PBS-Tween 20, se añadieron 100 µl de conjugado comercial anti IgG ratón-peroxidasa de rábano picante, diluido 1/2000 (Dako, Alemania). La placa se incubó nuevamente

durante 1h a 37°C. Transcurrido ese periodo de tiempo, se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 y se dispensaron en cada pozo 100 µl de orto-fenilendiamina (0,05%) y peróxido de hidrógeno (0,015%) en tampón citrato pH 5,0. La placa se incubó a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 20 minutos. La reacción se detuvo con 50 µL de ácido sulfúrico 2N y se realizó la lectura de la absorbancia a 492 nm en un lector de ELISA (Dynatech, USA).

Control negativo: consistió en una mezcla a partes iguales de muestras de suero de tres ratones sin infectar.

Control positivo: consistió en una mezcla a partes iguales de muestras de suero de dos ratones infectados con 500 huevos embrionados y sangrados a los 80 días pos infección (Rodrigues y col, 2017).

3.6.2. ELISA sándwich basado en nanocuerpos para detectar antígenos circulantes de *T. canis*

Previo a este estudio, los Ncs se expresaron como proteínas recombinantes en el Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular de la Universidad Libre de Bruselas. De manera abreviada, el constructo que codifica para el nanocuerpo 2TCE49 bivalente se insertó en el vector de expresión pBAD-17 y se cotransformó en la cepa de *Escherichia coli* WK6 con el plásmido pACYC184 (Avidity, USA, que codifica para una proteína ligasa de biotina). Posteriormente se indujo la expresión de las proteínas recombinantes, luego las bacterias se sometieron a tres ciclos de congelación descongelación y finalmente se incubaron en presencia de biotina. La purificación del nanocuerpo bivalente biotinilado se realizó mediante cromatografía de afinidad en una matriz de muteína-estreptavidina (Roche). El nanocuerpo 1TCE39 se acopló químicamente a peroxidasa de rábano picante (Abcam HRP conjugation kit, UK).

Para la realización del ELISA sándwich se recubrieron los pozos de una placa de microtitulación (NUNC-Maxisorp, Thermo Scientific, Alemania) con estreptavidina (Sigma, USA, 0,625 µg/mL) en tampón de recubrimiento, durante toda la noche a temperatura ambiente. A continuación se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 (0,05%). Posteriormente, se adicionaron 100 µL del nanocuerpo bivalente biotinilado 2TCE49 (0,78 µg/mL) diluido en PBS-Tween 20 (0,05%) y se incubaron durante una hora. Luego de tres lavados con PBS-Tween 20 (0,05%), se

bloquearon los espacios libres en los pozos con 200 μ l de Tampón bloqueador libre de proteínas (Thermo Scientific, USA), durante 2h. Se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 (0,05%). Seguidamente se depositaron 100 μ l de cada muestra (1/50, PBS-Tween 20, 0,05%) y se incubaron durante 1h. Se realizaron cinco lavados con PBS-Tween 20 (0,05%). Se adicionaron 100 μ l del nanocuerpo 1TCE39 conjugado con peroxidasa (0,008 μ g/mL) diluido en PBS-Tween 20 (0,05%). Se realizaron cinco lavados con PBS-Tween 20 (0,05%). Finalmente, se añadieron 100 μ l del sustrato tetrametilbencidina (TMB, BD Biosciences, USA) y la placa se incubó durante 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 μ l de H₂SO₄ (0,5M). Se determinó la absorbancia a 450 nm. En todos los casos los períodos de incubación se realizaron en agitación con excepción de la incubación con el sustrato.

Control negativo: consistió en una mezcla a partes iguales de muestras de suero de tres ratones sin infectar.

Control positivo: consistió en una mezcla a partes iguales de muestras de suero de tres ratones sin infectar a la que se añadió TES (2,6 ng/mL) (datos no publicados).

3.7. Conteo de larvas en órganos de los animales infectados y estudios histopatológicos

Transcurridos 45 días, a los animales se les aplicó eutanasia mediante dislocación cervical, para extraer hígado, pulmones y cerebro. De los 10 animales que conformaron cada grupo de experimentación, 7 se procesaron para determinar la carga larval. Los órganos se cortaron finamente y se incubaron en una solución de digestión (HCl 0,5%) durante 24h a 37°C. La suspensión resultante se centrifugó a 1000xg durante 10 min y se contaron las larvas presentes en el sedimento, bajo microscopio óptico. Se determinó el por ciento que representaban las larvas con respecto a la dosis de parásitos que se administró.

Los órganos que se extrajeron de los tres animales restantes se utilizaron para estudios histopatológicos. Las vísceras se enviaron al Departamento de Anatomía Patológica del IPK, donde se fijaron en formol a 5%. Luego se procedió a la observación macroscópica y posteriormente se procesaron mediante técnicas convencionales de inclusión en parafina,

cortes de 5 μm y tinción con hematoxilina-eosina. Se utilizó la tinción especial Luxol-fast-blue para evidenciar áreas de desmielinización. El diagnóstico se realizó con ayuda del microscopio óptico.

3.8. Análisis estadístico

Los datos se almacenaron en Excel. Las diferencias entre los grupos experimentales se determinaron usando la prueba de Kruskal-Wallis (más de dos muestras independientes) y la prueba de comparación múltiple de Dunn. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si $P < 0,05$. Los análisis se realizaron usando el paquete estadístico GraphPad Prism versión 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

3.9. Consideraciones éticas

Los procedimientos se realizaron basados en la Directiva 2010/63/UE, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. Los animales se mantuvieron en condiciones adecuadas según los requerimientos de su especie y se manipularon por personal calificado y que conocía las buenas prácticas en el manejo de los mismos. Se trabajó alejado de la dosis letal de infección de *T. canis*. Se utilizó solo la cantidad mínima necesaria de animales que permitiera realizar los análisis estadísticos imprescindibles. El protocolo de trabajo fue aprobado por el Comité de Ética del IPK (CEI-IPK 41-18).

4. Resultados

Aproximadamente 250 000 huevos de *T. canis* se incubaron en condiciones adecuadas en el laboratorio y se determinó periódicamente el porcentaje de huevos embrionados. Luego de 3 semanas de incubación, 57% de los huevos contenían una larva en su interior (Figura 4). En las dos semanas posteriores la proporción de huevos embrionados no se incrementó significativamente ($P>0,05$). Debido a esto en la quinta semana, al contar con 66,4% de huevos embrionados, una parte de la suspensión de huevos se destinó para obtener larvas. Se comprobó que la suspensión larval obtenida no contenía restos de los huevos cuyas larvas emergieron, o huevos sin embrionar. A continuación se infectaron los animales por vía oral con huevos embrionados, o con larvas por vía intraperitoneal.

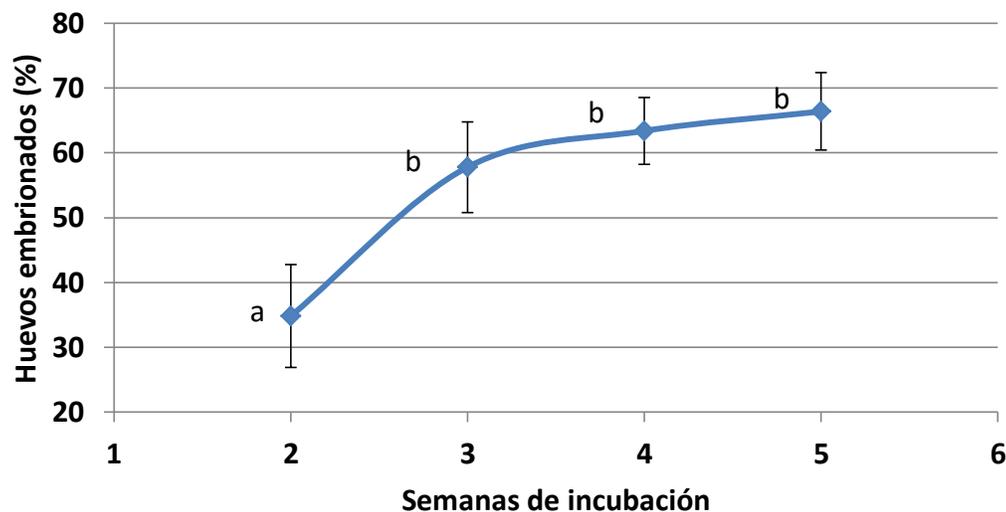


Figura 4. Comportamiento en el tiempo de la proporción de huevos de *Toxocara canis* embrionados durante incubación a temperatura ambiente en H_2SO_4 (0,2M). Las letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P<0,05$).

No se observaron problemas de bienestar en los animales, asociados a los procedimientos que se realizaron para infectar a los animales. Durante el seguimiento posterior, no se detectó piloerección y los animales no mostraron problemas relacionados con el acicalamiento, la locomoción, la respiración, ni se observaron convulsiones; tampoco se observó comportamiento agresivo, ni lesiones que así lo indicaran.

De manera general, en todos los grupos experimentales los ratones ganaron peso corporal progresivamente con alguna que otra pérdida puntual que no sobrepasó 10% del peso inicial (Figura 5). Un escaso número de animales sufrió pérdidas de peso sucesivas que en su mayoría se manifestaron en las primeras etapas del seguimiento. Esto ocurrió en todos los grupos experimentales, incluyendo los controles. En ningún caso las pérdidas sobrepasaron 20% del peso inicial, por lo que no fue necesario aplicar PFH. En el caso de los ratones infectados por vía oral, todos los animales completaron el estudio. Sin embargo, un animal infectado con 100 larvas por vía intraperitoneal, murió entre el 6to y el 8vo día pos infección, sin signos previos de enfermedad o pérdidas de peso de consideración.

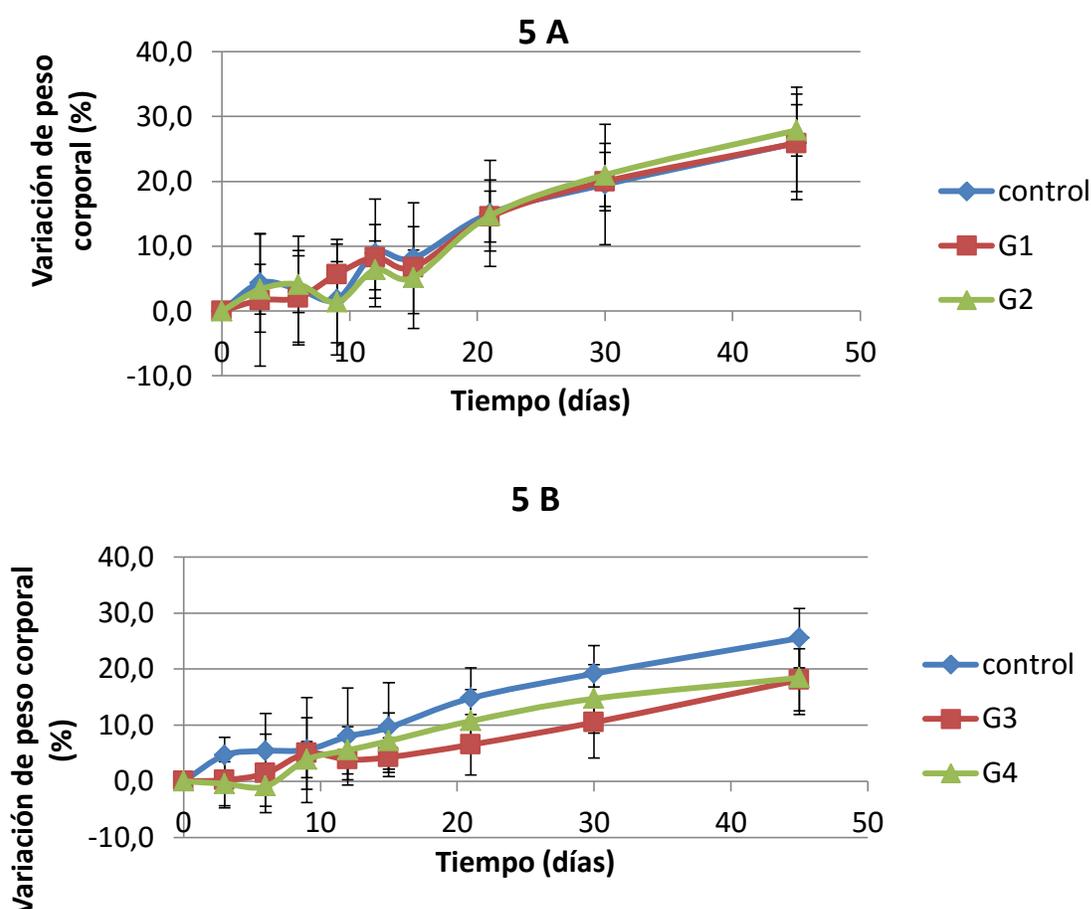


Figura 5. Comportamiento en el tiempo, del peso corporal con respecto al peso inicial, de los ratones BALB/c infectados por vía oral con huevos embrionados (A) o por vía intraperitoneal con larvas de *Toxocara canis* (B).

Transcurridos 45 días desde la infección, se demostró que todos los animales albergaban larvas en los tejidos. La presencia de larvas en cerebro, hígado y en los pulmones fue confirmada con ayuda del microscopio óptico luego de digestión ácida de los tejidos (Figura 6).

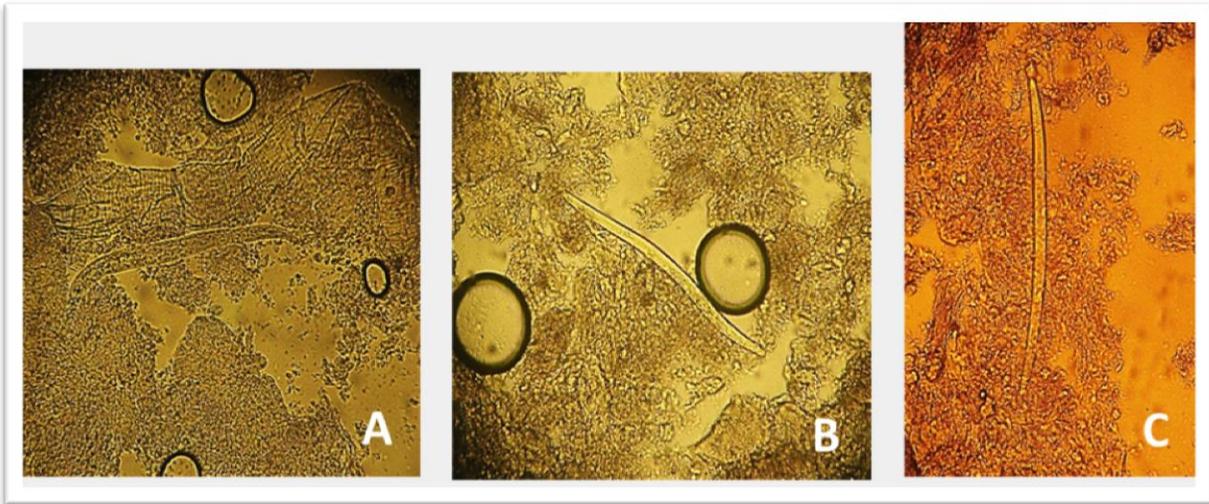


Figura 6. Larvas encontradas en cerebro (A y B) y en pulmones (C) de ratones BALB/c infectados con *Toxocara canis*, 200X.

De manera general, el cerebro fue el órgano más afectado, seguido de los pulmones ($P < 0,05$) (Figura 7). Es notorio que solo un ratón del G1 contenía una única larva en el hígado. La media del total de larvas encontradas en cada animal estuvo asociada con la dosis administrada ($P < 0,05$) y fue mayor en los animales inoculados con larvas que en los que se infectaron con huevos embrionados, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Tabla 2). El promedio del total de larvas encontradas por animal con respecto a la dosis de parásitos administrados en cada uno de los grupos (G1-G4) se correspondió con los siguientes porcentajes: 4,2%; 4,6%; 7,0% y 7,6%, respectivamente.

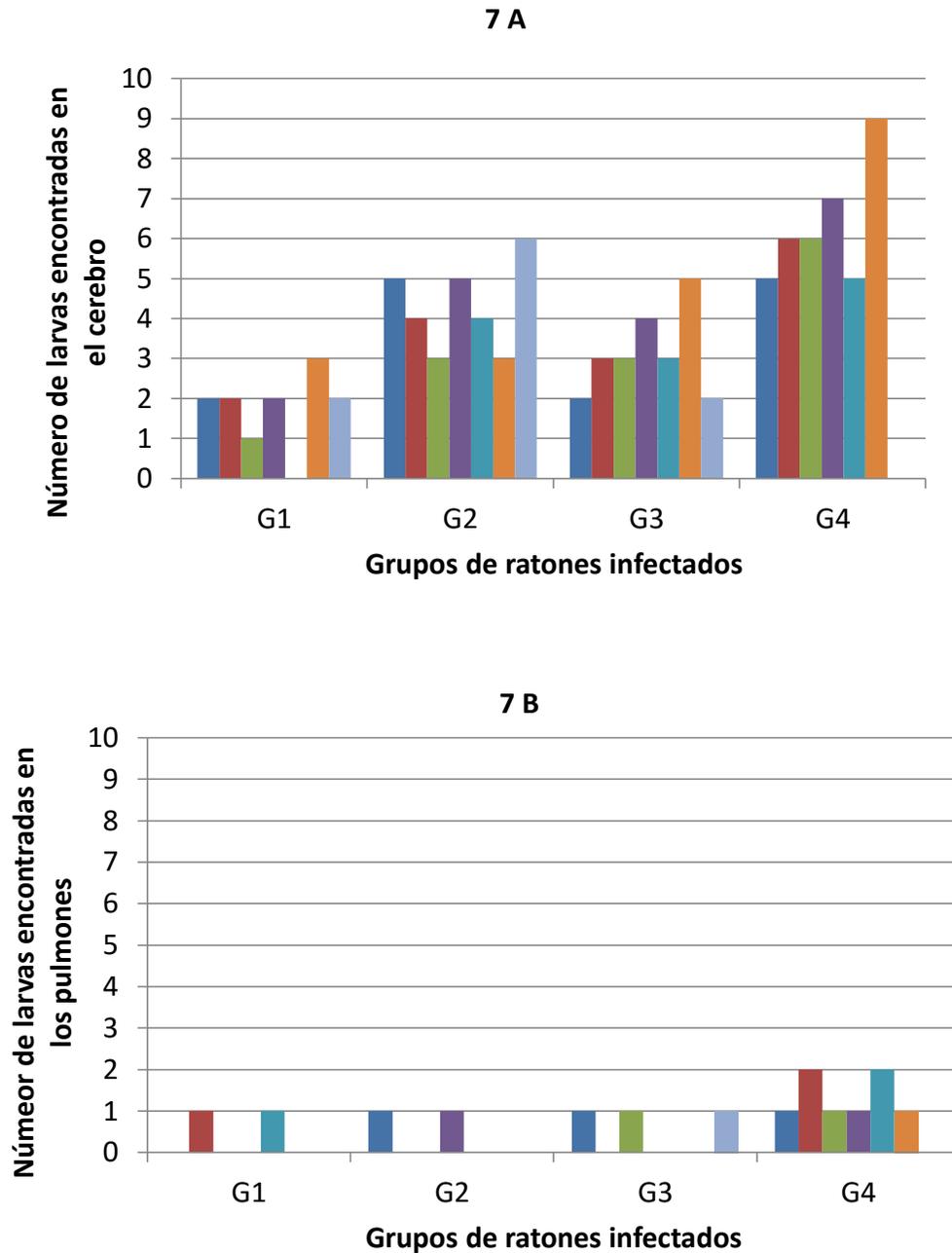


Figura 7. Número de larvas detectadas en órganos de animales transcurridos 45 días de infección experimental con *Toxocara canis*. Grupos 1 y 2: ratones infectados por vía oral con 50 o 100 huevos embrionados, respectivamente; grupos 3 y 4: ratones infectados por vía intraperitoneal con 50 o 100 larvas, respectivamente. Cada grupo se conformó con 7 animales, excepto el grupo 4 que estuvo conformado por 6 ratones.

Tabla 2. Mediana del número de larvas de *Toxocara canis* recuperadas de vísceras de ratones BALB/c transcurridos 45 días de la infección experimental, y porcentaje de la media de la carga larval por animal con respecto a la dosis de parásitos que se administró.

	G1 mediana	G2 mediana	G3 mediana	G4 mediana
cerebro	2	4	3	6
pulmones	0	0	0	1
hígado	0	0	0	0
Total	2 ^a	4 ^b	3 ^a	7,5 ^b
Media	2,1	4,6	3,6	7,7
Porcentaje respecto al inóculo	4,2	4,6	7,0	7,6

*Las letras indican diferencias significativas P=0,0001

Al examinar a simple vista los órganos que posteriormente se prepararon para estudios histopatológicos, ya fuera de los animales controles o de los que se infectaron con el parásito, no se encontraron lesiones evidentes. Los exámenes histopatológicos revelaron que las vísceras de los animales controles mostraron una apariencia histológica normal. Por otra parte los órganos de los animales infectados mostraron de manera general áreas con infiltrado inflamatorio crónico a ligero predominio de linfocitos. En los pulmones el infiltrado inflamatorio se encontró perivascular y peribronquial, mientras que en el hígado afectó los lobulillos, o tuvo localización subcapsular. En el cerebro se observó además del infiltrado inflamatorio, necrosis isquémica liquefactiva en parénquima y áreas focales de desmielinización.

En la tabla 3 se muestran en detalle los resultados del estudio histopatológico. La figura 8 ilustra los principales hallazgos. No se encontró relación entre los hallazgos histopatológicos y el tamaño del inóculo. Es necesario destacar que algunos cambios histopatológicos se encontraron exclusivamente en los animales inoculados con larvas (G3 y G4), por ejemplo: la detección de un granuloma y de una larva en la luz de un vaso y el incremento de ligero a moderado del infiltrado linfomonocitario, ambos en el tejido hepático, así como la presencia de zonas de necrosis isquémica en áreas del cerebro.

Tabla 3. Cambios histológicos observados en los tejidos de cerebro, pulmones e hígado de ratones, transcurridos 45 días de la infección experimental con *Toxocara canis*.

Órganos	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Pulmones	Congestión vascular, infiltrado inflamatorio crónico a ligero predominio de linfocitos ligero perivascular, focal, intersticial y peribronquial			
	Engrosamiento septal focal, necrosis fibrinoide de la pared de los vasos.	Extravasación de hematíes	Atelectasia y engrosamiento septal.	Infiltrado inflamatorio subpleural.
Hígado	Áreas extensas de necrosis isquémica rodeadas de infiltrado inflamatorio mononuclear a ligero predominio de linfocitos en los lobulillos, difusa balonización de hepatocitos.			
	Una de esas áreas era más extensa con linfocitos, plasmocitos y detritos celulares abundantes en parénquima o intersticial.	Ligero infiltrado inflamatorio linfocitario monocitario	Moderado infiltrado inflamatorio linfocitario monocitario, presencia de pigmento de hemosiderina en el parénquima intersticio	Moderado infiltrado inflamatorio linfocitario monocitario, con localización subcapsular, pigmento hemosiderina en parénquima. Granuloma con necrosis central. Se identificó una larva en la luz de un vaso.
Cerebro	Infiltrado inflamatorio crónico linfomonocitario			
	Ligero infiltrado inflamatorio	No se observaron otras alteraciones histológicas	Necrosis isquémica liquefactiva. Áreas focales de desmielinización.	Zonas de necrosis isquémica liquefactiva en parénquima.

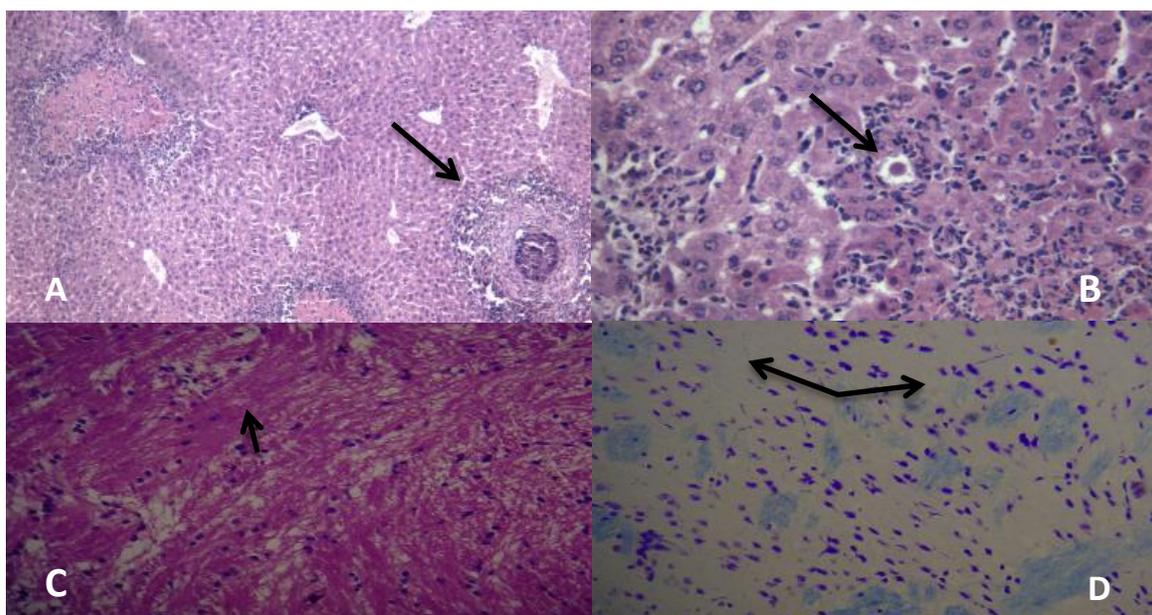


Figura 8. Cambios histopatológicos en los tejidos de ratones infectados con *Toxocara canis*. a) Granuloma con necrosis central en el tejido hepático, 100X. b) Larva de *T. canis* en la luz de un vaso del tejido hepático, 400X. c) Áreas de necrosis en cerebro, 400X. d) Áreas focales de desmielinización que se evidenciaron mediante la tinción especial Luxol-fast-blue, 400X.

En la figura 9 se muestra la cinética de TES y de anticuerpos IgG específicos vs. TES que se detectaron en el suero de los ratones involucrados en el estudio, mediante ensayos inmunoenzimáticos. En los ratones infectados con huevos embrionados (G1 y G2), los niveles de TES reconocidos en el ELISA sándwich se incrementaron a partir el tercer día, para luego mantenerse en valores más o menos constantes (Figura 9A). Los niveles de antígenos circulantes en ambos grupos se diferenciaron estadísticamente solo en los días 12, 15 y 21 ($P < 0,05$).

Por su parte en los animales del G1 y G2 los niveles séricos de anticuerpos IgG específicos comenzaron a incrementarse de manera sostenida a partir del día 15 hasta el día 45 (Figura 9A). No se encontraron diferencias significativas entre los niveles de anticuerpos en los grupos G1 y G2.

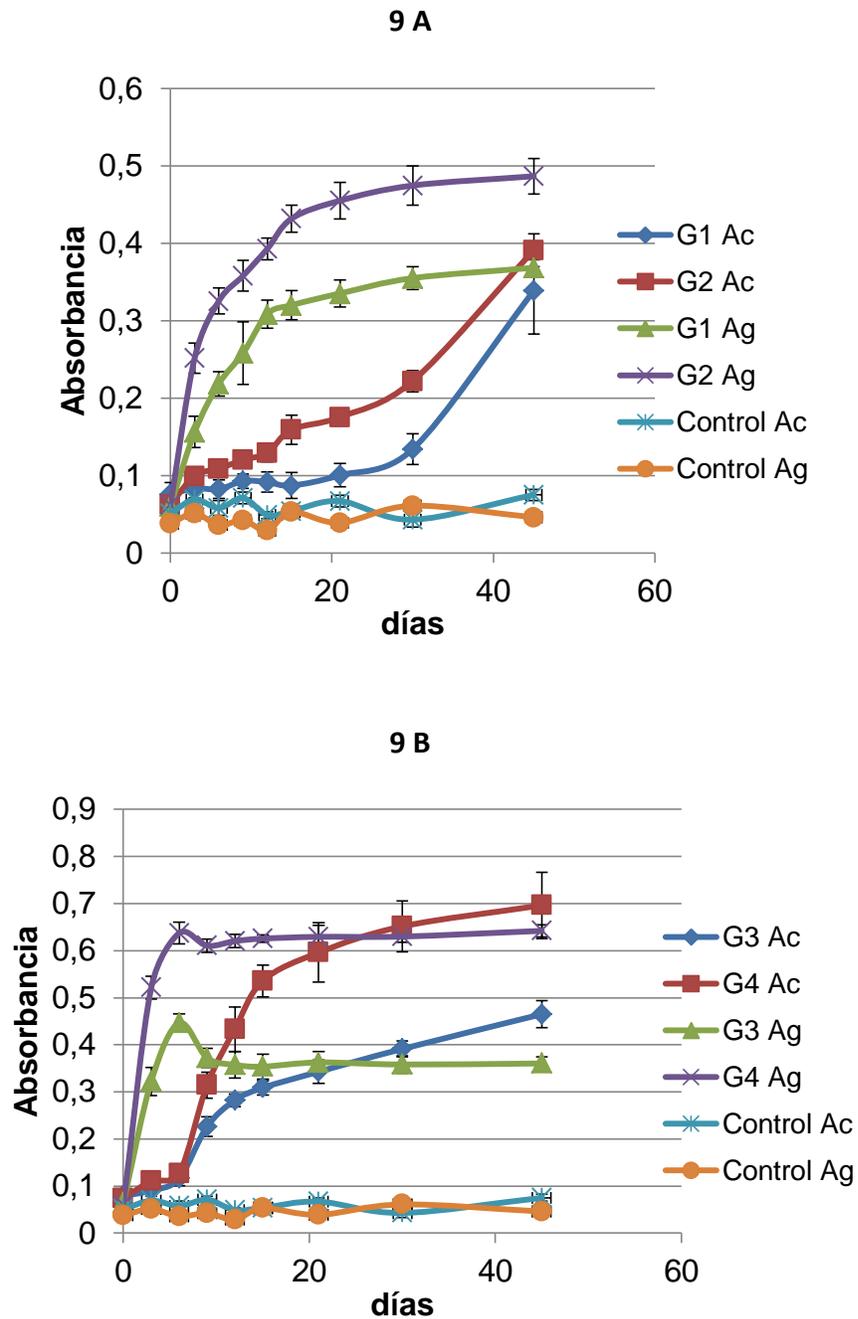


Figura 9. Cinética de anticuerpos IgG contra antígenos de excreción-secreción larvales y de antígenos reconocidos en el ELISA basado en nanocuerpos, en ratones infectados experimentalmente con *Toxocara canis*. Cada punto representa la media de siete muestras independientes, excepto en el G4 que fueron seis muestras.

En los grupos G3 y G4, el nivel de antígenos alcanzó su máximo en el sexto día para descender ligeramente en el noveno día y luego mantenerse estable hasta el final del experimento. El nivel de antígenos circulantes del G4 fue estadísticamente superior al del G3 a partir del día 12 ($P < 0,05$). Los niveles séricos de anticuerpos IgG específicos en los grupos G3 y G4 comenzaron a incrementarse desde el noveno día, manteniendo esta tendencia hasta el final del experimento (Figura 9B). No se encontraron diferencias significativas entre los niveles de anticuerpos en los grupos G3 y G4.

Al comparar los grupos G1 y G3, a los que se administraron 50 parásitos por diferentes vías, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los niveles de antígenos pero solo entre el tercer y el noveno día pos infección ($P < 0,05$). Lo mismo ocurrió cuando se compararon los niveles de antígenos entre los animales pertenecientes a los grupos 2 y 4 ($P < 0,05$). Con respecto a los niveles de anticuerpos IgG específicos, al comparar entre ellos, los grupos a los que se administraron 50 o 100 parásitos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas desde el noveno día hasta el final del experimento ($P < 0,05$).

5. Discusión

La toxocariasis es una de las helmintiasis más frecuentes a nivel global. La detección de laboratorio de la infección por *Toxocara* en el humano, se basa actualmente en la demostración de anticuerpos séricos, de tipo IgG, específicos contra el parásito. En realidad, más que una infección reciente que pudiera conducir a enfermedad, los niveles de inmunoglobulina G detectados pudieran ser un reflejo de la exposición al parásito.

No obstante, la detección de antígenos circulantes pudiera proveer una constancia de la infección activa. Sin embargo, hasta el presente, la detección de antígenos circulantes se ha visto obstaculizada por la necesidad de contar con un anticuerpo de captura de gran especificidad y por el requerimiento de disociar inmunocomplejos antes de realizar la detección. Con esto último se pretende incrementar la probabilidad de encontrar los antígenos, debido a que la L2 se encuentra en los tejidos y a que se sospecha que la carga larval puede ser baja en la mayoría de las infecciones humanas (Smith y col, 2009).

En este sentido, la plataforma tecnológica de producción de nanocuerpos se consideró apropiada para vencer los retos asociados al desarrollo de anticuerpos específicos para la detección de los antígenos circulantes en el suero humano. Esta plataforma tiene propiedades inherentes favorables como la construcción rápida de una genoteca, que contiene el repertorio completo de un animal inmunizado con la preparación antigénica de interés para luego seleccionar los nanocuerpos que más se ajusten a los objetivos propuestos. Los nanocuerpos muestran una alta afinidad y especificidad por sus antígenos diana y tienen, por su pequeño tamaño, la posibilidad de reconocer epitopes noveles. Además, los nanocuerpos pueden ser fácilmente modificados genéticamente para incrementar la sensibilidad de un ensayo, por ejemplo, creando constructos bivalentes (Huang y col, 2010).

Teniendo en cuenta lo expresado anteriormente, previo a esta investigación, se obtuvieron nanocuerpos específicos vs. TES y con ellos se desarrolló un inmunoensayo de tipo ELISA sándwich, que detecta los antígenos diana en el rango de los picogramos en un sistema

simulado (datos no publicados). Como parte del proceso de desarrollo del inmunoensayo y en ausencia de una prueba de certeza para la detección de la parasitosis en el humano, en la presente investigación se recurrió a la infección experimental en modelos animales, para conocer la cinética de los antígenos, que se reconocen en el nuevo ELISA desarrollado, en el suero.

Para desarrollar los experimentos se seleccionó el modelo murino ya que entre las especies de animales que se han usado como modelos de hospedero paraténico, para estudiar el efecto de la migración de las larvas, el ratón ha sido de los más utilizados, lo que se ha basado en la similitud entre los cambios que se producen en el animal infectado y los que ocurren en la TH (Maizels y col, 2003; Strube y col, 2013). Esto significa que el ratón constituye un modelo muy informativo para estudiar la distribución larval después de la infección y la contribución de la diversidad genética a la infección por *T. canis*.

Se ha comprobado que diferentes cepas de ratones exhiben un amplio rango de susceptibilidad a la infección por *Toxocara*. Mientras que algunas cepas son más resistentes, otras retienen un gran número de larvas en sus tejidos. Por ejemplo, los ratones de la cepa BALB/c, seleccionada para el presente estudio, se muestran excepcionalmente susceptibles a la infección por *T. canis*; o sea que en estos ratones la carga larval es mayor cuando se comparan con otras cepas de ratones (Bardón y col, 1994; Epe y col, 1994). Debido a esta particular susceptibilidad, los ratones BALB/c se han considerado el modelo más apropiado para la toxocariasis en varios estudios relacionados con el efecto de la dosis de inoculación en el daño a nivel del cerebro y en las estructuras de los ojos, o con la posible conexión con el desarrollo de asma alérgica (Pinelli y col, 2001; Hamilton y col, 2006; Ollero y col, 2008). Los ratones BALB/c también han sido usados para estudiar la respuesta inmune humoral y celular que se produce a consecuencia de la infección por *T. canis* (Cuéllar y col, 1990; Pinelli y col, 2005; Chieffi y col 2009; Rodrigues y col, 2017).

Para desarrollar la infección experimental es necesario contar con una cantidad apreciable de huevos embrionados. Por eso en el laboratorio se intenta reproducir las condiciones óptimas para que ocurra la embriogénesis de forma exitosa. Se ha planteado que los huevos embrionan en el medio ambiente en un período que oscila entre 9 y 15 días, si las condiciones de temperatura y humedad son óptimas (Schneider y col, 2011). En regiones templadas, los huevos se convierten en infectivos luego de 4 a 6 semanas (Zibaei y col, 2010). En el presente trabajo, con el método empleado, se logró la embriogénesis *in vitro* de más de 60% de los huevos colectados, lo que fue ligeramente superior a lo encontrado por Resende y col (2015), que reportaron una proporción de 53%, que se mantuvo estable hasta el final del experimento. Estos investigadores usaron una temperatura controlada de 26°C durante todo el experimento, mientras que en el trabajo actual los huevos se mantuvieron a temperatura ambiente, con agitación periódica y con luz artificial durante la incubación.

El hecho de que no se alcanzaran porcentajes más elevados de embriogénesis, al igual que en el trabajo de Resende y colaboradores (2015), pudiera estar relacionado con que se partiera de la masa total de huevos contenida en el útero de las hembras disectadas, lo que incluye una proporción de huevos aún infértiles. Algunos autores han desarrollado métodos para obtener mayor porcentaje de huevos embrionados. El método de De Savigny recomienda el uso de la porción anterior no bifurcada del útero, donde la proporción de huevos fértiles es mayor (De Savigny, 1975). Otros autores suspendieron las hembras adultas del parásito en PBS-glucosa 2%, pH 7, que se suplementó con plasma humano 1% e incubaron la suspensión a 37°C. Los parásitos se mantuvieron vivos una semana, de manera que los investigadores colectaron diariamente los huevos que los parásitos secretaban. Este método tiene el inconveniente de que debe prestarse especial atención a la eliminación de bacterias contaminantes. Los autores usaron una brocha para limpiar al parásito y un lavado en formaldehído a 1%, para impedir la contaminación y la muerte prematura del parásito (Rodríguez-Caballero y col, 2007). Al comparar con el método tradicional de escisión del útero, los autores no encontraron diferencias significativas en cuanto a la cantidad total de huevos obtenidos, pero sí en cuanto a

la proporción de huevos embrionados, que fue significativamente mayor (68,2%) al contabilizar la masa total de huevos obtenidos luego de una semana de incubación de las hembras adultas.

Una vez que se cuenta con cantidades suficientes de huevos embrionados estos pueden ser usados directamente para infectar los ratones o se puede provocar la salida de las larvas para infectar con ellas a los animales por vía intraperitoneal, sobre todo si se considera que de todos los huevos pueden no emerger larvas. Para la administración de los parásitos a los animales se ha sugerido contar los parásitos con precisión para garantizar resultados reproducibles (Holland y Smith, 2006). Por eso en el presente estudio, se tomaron 10 alícuotas de la suspensión de parásitos, cuyos conteos en cámara de Neubauer se promediaron y la suspensión de parásitos se mantuvo en agitación durante los procesos de conteo y de administración.

En los experimentos con ratones, la dosis de infección reportada ha variado ampliamente según los propósitos de cada investigación. Se han utilizado dosis que varían desde 5 hasta más de 1000 huevos embrionados (Cox y Holland, 2001; Resende y col, 2015; Rodrigues y col, 2017). Algunos autores han planteado que dosis bajas representan mejor a la mayoría de las infecciones humanas, que se suponen transcurren con baja carga larval (Cox y Holland 2001). Othman (2012) estableció un paralelismo entre la infección en el humano y en el ratón, y estimó que si se tiene en cuenta un ratón con peso de alrededor de 35g y que sea infectado con dosis entre 500 y 2000 huevos embrionados, esto podría corresponderse con una dosis de 1-4 millones de huevos en un humano adulto. Esta situación es poco probable en humanos, excepto en niños con intensa geofagia que viven o juegan en ambientes altamente contaminados (Magnaval y col, 2005). Debido a esto en la presente investigación se seleccionaron dosis bajas para infectar a los ratones, pero a la vez suficientes para permitir la determinación de la carga larval.

Contrario a lo que podría esperarse, no se encontraron problemas de bienestar en los animales asociados a la administración del parásito, ni al desarrollo posterior de la infección. Durante el seguimiento periódico de los animales, la única variable que se afectó fue el peso corporal.

Debido a que las disminuciones de peso no afectaron a todos los animales por igual y a que también se produjeron en animales de los grupos controles, consideramos que pudieran estar asociadas con la extracción frecuente de muestras de sangre. Aunque los volúmenes de sangre extraídos en cada ocasión no rebasaron los límites permitidos para la especie, pudiera ser que algunos animales necesitaran un mayor tiempo para reponer el volumen perdido, o que la manipulación frecuente indujera mayor estrés en ellos. En línea con este pensamiento la directiva europea 2010/63/EU, sobre la protección de los animales utilizados para fines científicos, contempla entre los elementos que deben tomarse en consideración y ponderarse al evaluar la severidad real de los procedimientos, la utilización de procesos repetidos y los intervalos entre éstos.

El hecho de que se produjera la muerte prematura de un animal contrasta con la ausencia de signos clínicos relacionados con la infección. El animal en cuestión tampoco había sufrido pérdidas de peso notables. El hecho es más notorio aún si se tiene en cuenta que en otras investigaciones se inocularon ratones BALB/c con una dosis hasta 10 veces mayor y no se notificó mortalidad en los animales (Cox y Holland, 2001, Resende y col, 2015). Esto nos lleva a especular sobre la posibilidad de que el animal sufriera alguna condición de salud que se agravó durante la experimentación.

La ausencia de clínica relacionada con la toxocariasis en ratones infectados experimentalmente ya había sido señalada por Epe y colaboradores (1994), quienes determinaron las diferencias en varias cepas de ratones (BALB, C3H, C57Bl, DBA y NMRI) en cuanto a la distribución larval y al curso patofisiológico de la infección. Estos autores encontraron que aunque la carga larval es mayor en ratones BALB/c, estos animales usualmente no muestran signos clínicos, mientras que varios ejemplares de otras cepas murieron entre las semanas 17-21 pos-infección, luego de mostrar signos relacionados con afectaciones del SNC. Estas manifestaciones clínicas pueden ser: desinterés, somnolencia, cifosis, paresia, incoordinación y temblor (Epe y col, 1994; Cox y Holland, 2001).

Otros autores realizaron estudios de comportamiento en ratones no consanguíneos LACA, que se infectaron con dosis que variaron entre 100 y 3000 huevos. Como resultado, encontraron una fuerte correlación entre el número de larvas recobradas de los cerebros y el comportamiento social y la ansiedad. Los valores mayores de larvas se relacionaron con comportamiento social anormal en términos de agresividad reducida, mientras que un bajo número de larvas se relacionó con una disminución del número de veces que los animales infectados son capaces de detectar un riesgo potencial. Ambos factores podrían resultar en una mayor susceptibilidad a los predadores potenciales en el ambiente (Cox y Holland, 1998, 2001; Hamilton y col, 2006).

En cuanto a la distribución de las larvas en órganos y tejidos una vez que los animales han sido infectados, en general se ha planteado que el comportamiento migratorio comprende en dos fases, la fase hepatopulmonar y la fase mio-neurotrópica. La primera ocurre durante la primera semana después de la infección cuando las larvas alcanzan el hígado y pulmones; la segunda, cuando las larvas migran a través del cuerpo y se acumulan en el Sistema osteomioarticular y en el cerebro (Abo-Shehada yHerbert, 1984a). Se considera que una larva encapsulada puede permanecer viable hasta 10 años después (Sprent 1952, Beaver, 1962).

Sin embargo, una revisión que realizó Othman (2012) mostró que en realidad existen controversias sobre la ruta migratoria y la acumulación de larvas en diferentes órganos durante las fases aguda y crónica. O sea que algunos autores encontraron una acumulación progresiva de larvas en el cerebro de los ratones a lo largo del tiempo (Kayes y Oaks, 1976; Dunsmore y col, 1983), mientras que otros afirmaron que el máximo de acumulación larval en el cerebro es a los 14 días pos infección seguido por un declive progresivo (Lamina, 1964; Piergili y col, 1989).

En un intento por reconciliar estas observaciones, Othman (2012) concluyó que la migración de las larvas es un proceso continuo, que muy probablemente no consiste solo en una simple ruta unidireccional desde la pared del intestino, a través de los pulmones para finalizar en el cerebro y propone que las larvas podrían acumularse en el cerebro pero, mientras tanto, se someten a

un proceso de migración y redistribución continua dentro del hospedero paraténico. Por lo tanto, las larvas pueden dejar el cerebro para migrar por los tejidos y continuar de nuevo su camino hacia el cerebro. Esta hipótesis está implícita en los informes de varios autores (Lee, 1960, Ho y col, 1974, Cookston y col, 1990, Kayes, 1997). Las evidencias que se han aportado para esta suposición son el examen histopatológico del hígado en el día 35 pos infección, que reveló la presencia de larvas migratorias que no estaban rodeadas por una reacción inflamatoria. Por otra parte, en la misma sección de tejido, se detectaron granulomas de diferentes edades (Othman y col, 2011). Esto indicó migración larval continua a través del hígado, aunque probablemente se tratara de un número pequeño de larvas.

En los estudios publicados se suele expresar la carga larval en relación a la dosis de parásitos administrados, aun así la comparación con otros estudios se dificulta pues existe gran variedad en la cepa de ratón usada, en las dosis de parásitos administrados y en el día seleccionado para la aplicación de la eutanasia. Cuando se analiza la media de larvas encontradas por ratón en cada grupo en comparación con la dosis administrada, uno pudiera considerar como baja la cantidad de larvas detectadas, sin embargo no podemos descartar que pudiera haber larvas migrando por otros órganos y tejidos como riñones, corazón y músculos que no fueron objeto de análisis en el presente trabajo. La carga larval encontrada en los ratones del G1 fue menor que la encontrada por Rodrigues y colaboradores (2017) que fue de 14,33%. Sin embargo, estos autores estudiaron la carcasa del animal, pero no los pulmones.

El hecho de que la media del número de larvas por ratón sea mayor en los animales infectados con larvas que con huevos embrionados, para cada una de las dosis administradas, pudiera estar relacionado con que no todas las larvas emergieran de los huevos, o no todas las que emergieron llegaron al torrente sanguíneo. Como evidencia de que no todas las larvas logran mantenerse en los órganos y tejido internos, se han detectado larvas en las heces de los ratones entre el tercer y el quinto día post infección (Abo-Shehada y Herbert, 1984).

En la presente investigación se encontraron larvas en el cerebro de todos los animales a los que se les administró el parásito y este órgano fue en el que se encontró una mayor carga larval. Dunsmore y colaboradores (1983) publicaron evidencia cuantitativa de la acumulación de larvas en el cerebro. Esto se relacionó con observaciones realizadas por Sprent (1955) y Burren (1971) de que la larva en el cerebro no está encapsulada o rodeada de células inmunes, lo que se sugiere es ventajoso para el parásito. Más allá, se considera que la acumulación de larvas en el cerebro es una forma en la que el parásito se mantiene vivo y se puede transmitir a un hospedero definitivo que ingiera tejido cerebral procedente de un murino infectado.

Otros autores han reportado la afinidad de las larvas por el cerebro en los ratones infectados (Cuéllar y col 1990, Guardis y col 2002, Janecek y col 2014). No obstante, en la investigación actual, el porcentaje de larvas en este órgano fue menor que el encontrado por Rodrigues y colaboradores (2017) (6%) que también infectaron ratones BALB/c con una dosis de 50 huevos embrionados, pero sometieron los animales a eutanasia a los 120 días. Los resultados del presente estudio fueron similares a los obtenidos por Cox y Holland (2001) que infectaron ratones LACA entre 4 y 5 semanas de nacidos con 100 huevos embrionados y contaron los parásitos que se encontraban en el cerebro a los 70 días y recobraron 4,4% de la dosis inicial. Aún con una dosis de 3000 huevos embrionados, solo recobraron 6,1% del inóculo.

En el presente trabajo el pulmón constituyó el segundo órgano con mayor carga larval entre los estudiados. Nuevamente el escaso número de investigaciones dificulta contrastar los resultados. Se plantea que el número de larvas alcanza su máximo en este órgano, el tercer día de la infección (Abo-Shehada y Herbert, 1984; Resende y col, 2015). Zevallos y colaboradores (2015) infectaron ratones BALB/c con una dosis de 300 huevos embrionados, y encontraron en pulmón una media de 0,4 larvas por animal, más baja que la encontrada en la presente investigación, pero determinaron la carga larval en pulmón a los 120 días de infección.

El hígado por su parte, de los órganos estudiados, fue el menos afectado. Similar resultado encontraron Piergili Fioretti y colaboradores (1989) y Camparoto y colaboradores (2008). De

igual manera, Havasiová-Reiterová y colaboradores (1995) que usaron ratones C57Bl6/J y dosis entre 5 y 500 huevos embrionados, encontraron que ninguno de los ratones infectados con dosis bajas, presentaron larvas en el hígado. Con una dosis mayor (1000 huevos), solo un ratón albergaba larvas en el hígado. En nuestro caso, la casi ausencia de los parásitos en el hígado y su mayor presencia en el cerebro nos indica que, los parásitos pudieran encontrarse en la fase mio-neurotrópica de migración.

Por su parte los hallazgos histopatológicos se correspondieron con los publicados por otros autores. Los exámenes patológicos de cerebros de ratones infectados han revelado desmielinización focal, malacia e infiltración de células mixtas (Epe y col, 1994; Kayes, 1997).

Con anterioridad otros autores describieron cambios neuropatológicos similares que predominaron en los tractos fuertemente mielinizados del cerebro como el cuerpo caloso, cápsulas internas y externas, pedúnculos cerebelares y médula espinal (Summers y col, 1983; Dolinsky y col, 1985). Estos resultados condujeron a la conclusión de que la larva manifiesta afinidad por la materia blanca del cerebro (Holland y Hamilton, 2006). Más tarde, Cardillo y colaboradores (2009) informaron áreas de hemorragia, congestión y necrosis neuronal sin reacción de la microglia; además, focos hemorrágicos en los pulmones de animales infectados, y consolidación pulmonar hemorrágica. También se observaron que las larvas en el músculo esquelético y otros órganos de huéspedes paraténicos están encerrados en granulomas, lo que no ocurre en el cerebro, como se explicó anteriormente (Burren, 1968; Kayes y Oaks, 1978; Parsons, 1987). La presencia de infiltrado inflamatorio y de áreas de necrosis en el tejido hepático también había sido notificado por Resende y colaboradores (2015).

Llama la atención el hecho de que a pesar de que las larvas predominaron en el cerebro de los animales en todos los grupos experimentales, no se encontraron en los cortes histológicos analizados, lo que pudiera deberse a que en los estudios histopatológicos se analizaron cortes muy finos tomados de manera aleatoria de la víscera embebida en parafina, por lo que las larvas pudieran encontrarse en porciones no estudiadas de los órganos. El hecho de haber

encontrado una larva en la luz de un vaso del tejido hepático, transcurridos 45 días de la infección con *T. canis*, parece estar en línea con la teoría de Othman (2012) explicada anteriormente, acerca de que las larvas se encuentran en un proceso de redistribución continua dentro del hospedero.

Es notorio que se haya observado la presencia de un granuloma en el tejido hepático en ausencia de la larva que le dio origen. Sin embargo, se ha planteado que las larvas pueden abandonar los confines de un granuloma fibróticamente encapsulado, migrar a otro lugar y comenzar el proceso granulomatoso de nuevo. Por lo que no es poco común cortar secciones en serie a través de un granuloma completo y no encontrar ninguna evidencia de la larva que sirvió de origen a la reacción inflamatoria abundante en eosinófilos. Esto puede reflejar lo que se conoce como reactivación de las larvas hipobióticas (Holland y Smith, 2006). La causa de este comportamiento no ha sido dilucidada aún.

Precisamente, las reacciones granulomatosas capaces de encapsular las larvas viables de tercer estadio de *Toxocara*, no son más que una manifestación de la respuesta inmune dependiente de células T que desencadena el parásito. Se ha comprobado que la infección por *T. canis* induce una respuesta inmune tipo Th2, con la producción de IgG1 e IgE y de las citosinas IL-4, IL-5 (Del Prete y col, 1991; Wang y col, 1995; Kayes, 1997; Kuroda y col, 2001). De manera general, la citosina IL-4 estimula a las células B a cambiar de una respuesta IgM a una respuesta IgG, IgA y a IgE (Kayes, 2006). La citosina IL-5 se considera una citosina eosinopoyética (Iyer y Cheng, 2012).

La respuesta de anticuerpos que desencadena el parásito se puede detectar usando los TES. Estos antígenos tiene un papel central en la interacción con el hospedero. Incluso se ha comprobado que la respuesta inmune tipo Th2 también puede ser inducida mediante la inoculación directa de TES en el hospedador, en ausencia de parásitos vivos (Sugane y Oshima, 1984). Las investigaciones que se han dedicado a estudiar la respuesta inmune luego de la infección experimental en ratones han encontrado que la magnitud de la respuesta inmune es

directamente proporcional al número de huevos administrados en el huésped paraténico (Kayes, 2006).

Se ha encontrado que inóculos tan bajos como de 5 huevos son suficientes para provocar una respuesta inmune detectable (Rodrigues y col, 2017). Por su parte ya desde 1985, Kayes y colaboradores, trabajando con ratones consanguíneos CBA/J, notificaron que los niveles de anticuerpos se incrementaron proporcionalmente a la vez que se incrementó la cantidad de parásitos administrados, lo que contrasta con nuestros resultados, aunque estos autores usaron dosis que oscilaron entre 5 y 250 huevos embrionados.

Estos autores también encontraron que los niveles de anticuerpos detectados al administrar entre 5 y 125 huevos embrionados se incrementaron desde la segunda hasta la cuarta semana pos infección. Nuestros resultados están en concordancia con estos hallazgos. Similares resultados obtuvieron Reis y colaboradores (2017) y Rodríguez-Caballero y colaboradores (2017), que infectaron ratones BALB/c con 50 huevos embrionados, mientras que los segundos usaron además la dosis de 100 huevos embrionados.

Cuando los ratones se infectaron con larvas, los niveles de anticuerpos se incrementaron antes con respecto a los animales infectados con huevos embrionados, este hecho ya había sido descrito por Rodríguez-Caballero y colaboradores (2017). Esto pudiera deberse a que las larvas inoculadas por vía intraperitoneal alcanzan el torrente sanguíneo más rápido que aquellas que emergen de los huevos en el intestino del hospedero.

En todos los animales a los que se les administró el parásito, se detectó la presencia de antígenos circulantes desde el tercer día pos infección, los niveles de antígenos permanecieron detectables hasta el final del experimento, lo que indicó la presencia de larvas vivas, como se demostró transcurridos 45 días pos infección en las vísceras analizadas. Los niveles de antígenos circulantes descendieron ligeramente después de la primera semana pos infección, para luego mantenerse más o menos estables hasta el final del experimento. Este

comportamiento fue más notorio en los animales infectados con larvas. Este hecho pudiera corresponderse con el incremento de los niveles de anticuerpos IgG en suero que pudieran unir los antígenos y removerlos de la circulación. Similares hallazgos notificaron otros autores que también desarrollaron inmunoensayos para la detección de antígenos circulantes (Bowman y col, 1986; Robertson y col 1988; Rodríguez-Caballero y col, 2017). Sin embargo, Robertson y colaboradores (1988) luego de infectar ratones BALB/c con una dosis de 1000 huevos embrionados encontraron que los antígenos reconocidos en el ELISA de dos sitios que habían desarrollado, fueron detectables solo hasta el séptimo día de la infección.

Llama la atención el hecho de que para que fuera posible detectar los antígenos de excreción-secreción hasta el momento ha sido necesario realizar la disociación de inmunocomplejos presentes en el suero de los animales de experimentación, para incrementar la posibilidad de su captura. Sin embargo, en nuestro caso esto no fue necesario, lo que indica la gran sensibilidad del ELISA basado en el uso de nanocuerpos, cuyo límite de detección está en el rango de los picogramos de TES.

El análisis de los resultados en conjunto nos indica que aún en animales infectados con una baja carga del parásito es posible detectar antígenos séricos circulantes con el nuevo ELISA sándwich desarrollado sin necesidad de disociar los inmunocomplejos circulantes, lo que indica la gran sensibilidad del inmunoensayo. Los antígenos diana además, perduran en el tiempo y sus niveles parecen estar relacionados con la cantidad de larvas presentes en los tejidos, cuestión que debe ser objeto de una investigación que abarque un rango más amplio en cuanto al tamaño del inóculo.

6. Conclusiones

- La carga larval por animal fue directamente proporcional a la dosis parasitaria administrada.
- El cerebro fue el órgano con mayor carga larval, seguido por pulmones e hígado.
- El principal cambio histopatológico encontrado fue la presencia de infiltrado inflamatorio crónico a ligero predominio de linfocitos.
- No se evidenció relación entre los hallazgos histopatológicos y el tamaño del inóculo.
- Los niveles de antígenos de excreción-secreción larvales circulantes en el suero de los animales infectados se incrementaron paulatinamente a partir del tercer día pos infección hasta alcanzar valores estables, esto último coincidió con el incremento de la producción de inmunoglobulinas IgG específicas contra estos antígenos.
- Se encontró relación entre los niveles de antígenos de excreción-secreción larvales circulantes en el suero y el tamaño del inóculo.
- No se encontró relación entre los niveles de inmunoglobulinas IgG y la dosis de parásitos administrada.

Recomendaciones

- Estudiar la cinética de antígenos circulantes en la toxocariasis murina experimental utilizando dosis de infección más bajas, con el empleo del ELISA sándwich basado en nanocuerpos.
- Estudiar la circulación de antígenos de excreción-secreción larvales en el suero de ratones en fase crónica de infección con la utilización de la técnica de ELISA sándwich basado en nanocuerpos, antes y después de aplicado el tratamiento medicamentoso recomendado.

Bibliografía

- Abo-Shehada MN, Herbert IV. The migration of larval *Toxocara canis* in mice II. Post-intestinal migration in primary infections. *Vet Parasitol.* 1984; 17: 75-83.
- Ahn SJ, Ryoo NK, Woo SJ. Ocular toxocariasis: clinical features, diagnosis, treatment, and prevention. *Asia Pac Allergy.* 2014; 4: 134-41.
- Ahn SJ, Woo SJ, Jin Y, Chang YS, Kim TW, Ahn J, et al. Clinical features and course of ocular toxocariasis in adults. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8: e2938. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002938>.
- Alonso JM, Stein M, Chamorro MC, Bojanich MV. Contamination of soils with eggs of *Toxocara* in a subtropical city in Argentina. *J Helminthol.* 2001; 75: 165-8.
- Araujo P. [Findings related to the 1st ecdysis of *Ascaris lumbricoides*, *A. suum* and *Toxocara canis* larvae]. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo.* 1972; 14: 83-90.
- Bardón R, Cuéllar C, Guillén JL. Larval distribution of *Toxocara canis* in BALB/c mice at nine weeks and one year post-inoculation. *J Helminthol.* 1994; 68: 359-60
- Beaver PC. Toxocariasis (visceral larva migrans) in relation to tropical eosinophilia. *Bull Soc Pathol Exot Filiales.* 1962; 55: 555-76.
- Borecka A, Gawor J. Modification of gDNA extraction from soil for PCR designed for the routine examination of soil samples contaminated with *Toxocara* spp. eggs. *J Helminthol.* 2008; 82: 119–22.
- Borecka A., Gawor J, Niedworok, M, Sordyl B. Occurrence of *Toxocara* spp. eggs in household environment of children with diagnosed Toxocariasis in Łódź voivodeship. *Wiad Parazytol.* 2010; 56: 141-4.
- Botero D, Restrepo M. *Parasitosis humanas.* 4ta ed. Medellín, Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2003.
- Bowman DD, Mika-Grieve M, Grieve RB. Circulating excretory-secretory antigen levels and specific antibody responses in mice infected with *Toxocara canis*. *Am J Trop Med Hyg.* 1986; 36: 75.

- Brunaská M, Dubinský P, Reiterová K. *Toxocara canis*: ultrastructural aspects of larval moulting in the maturing eggs. *Int J Parasitol.* 1995; 25: 683-90.
- Buijs J, Van Knapen F. *Toxocara* infection in children and the relation with allergic manifestations. *Vet Q.* 1994; 16: 13S-14S.
- Burren CH. Experimental toxocariasis I. Some observations on the histopathology of the migration of *Toxocara canis* larvae in the mouse. *Z Parasitenkd.* 1968; 30: 152–61.
- Burren CH. The distribution of *Toxocara* larvae in the central nervous system of the mouse. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1971; 65: 450-3.
- Camparoto ML, Fulan B, Colli CM, Paludo ML, Falavigna-Guilherme AL, Fernandez MA. Initial stage of development and migratory behavior of *Toxocara canis* larvae in BALB/c mouse experimental model. *Genet Mol. Res.* 2008; 7: 444-50.
- Cardillo N, Rosa A, Ribicich M, López C, Sommerfelt, I. Experimental infection with *Toxocara cati* in BALB/c mice, migratory behaviour and pathological changes. *Zoonoses Public Health.* 2009; 56: 198–205.
- Caumes E. Treatment of cutaneous larva migrans and *Toxocara* infection. *Fundam Clin Pharmacol.* 2003; 17: 213–6.
- Çelik T, Kaplan Y, Ataş E, Öztuna D, Berilgen S. *Toxocara* seroprevalence in patients with idiopathic Parkinson's disease: chance association or coincidence? *Biomed Res Int.* 2013; 2013: 685196.
- Chen J, Zhou DH, Nisbet AJ, Xu MJ, Huang SY, Li MW, Wang CR, Zhu XQ. Advances in molecular identification, taxonomy, genetic variation and diagnosis of *Toxocara* spp. *Infect Genet Evol.* 2012; 12: 1344–8.
- Chen Jia, Liu Quan, Liu Guo-Hua, Zheng Wen-Bin, Hong Sung-Jong, Sugiyama Hiromu, *et al.* Toxocariasis: a silent threat with a progressive public health impact. *Infect Dis Pov.* 2018; 7: 1-13.

Chieffi PP, Santos SV, Queiroz ML, Lescano SAZ. Human toxocariasis: contribution by Brazilian researchers. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2009; 51: 301-8.

Cookston M, Stober, M, Kayes SG. Eosinophilic myocarditis in CBA/J mice infected with *Toxocara canis*. *Am J Pathol*. 1990; 136: 1137-45.

Cortez RT, Ramirez G, Collet L, Giuliari GP. Ocular parasitic diseases: a review on toxocariasis and diffuse unilateral subacute neuroretinitis. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 2011; 48: 204-12.

Cox DM, Holland CV. Influence of mouse strain, infective dose and larval burden in the brain on activity in *Toxocara*-infected mice. *J Helminthol*. 2001; 75: 23-32.

Cox DM, Holland CV. The relationship between numbers of larvae recovered from the brain of *Toxocara canis*-infected mice and social behaviour and anxiety in the host. *Parasitology*. 1998; 116: 579-94

Cuéllar C, Fenoy S, Guillén JL. Dinámica de la respuesta humoral en dos cepas murinas. I. Inoculación con huevos embrionados de *Toxocara canis*, *Toxascaris leonina* y *Ascaris suum*. *Rev Iber Parasitol*. 1990; 50: 137-50.

de Savigny DH. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for the uses in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *J Parasitol*. 1975; 61: 781-782.

Del Prete G, Mastromauro C, Biagiotti R, Macchia D, Falagiani P, Ricci M, *et al*. Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *J Clin Investig*. 1991; 88: 346-50.

Dernouchamps JP, Verougstraete C, Demolder E. Ocular Toxocariasis: a presumed case of peripheral granuloma. *Int Ophthalmol*. 1990; 14: 383-8.

Despommier D. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clin Microbiol Rev*. 2003; 16: 265-72.

- Do Lago A, Andrade R, Muccioli C, Belfort R. Optical coherence tomography in presumed subretinal *Toxocara* granuloma: case report. *Arq Bras Oftalmol*. 2006; 69: 403-5
- Dolinsky ZS, Hardy CA, Burrig RG, Donovan PJ. The progression of behavioral and pathological effects of the parasite *Toxocara canis* in the mouse. *Physio. Behav*. 1985; 35: 33-42.
- Dumenigo B, Lau N, Bravo JR. Prevalencia de *Toxocara canis* en perros de Ciudad de La Habana. *Rev Cubana Med Trop*. 1994; 46: 99-102.
- Dunsmore JD, Thompson RC, Bates IA. The accumulation of *Toxocara canis* larvae in the brains of mice. *Int J Parasitol*. 1983; 13: 517-21.
- Durette-Desset MC, Chabaud AG. Three new nematode parasites of the water-chevrotain *Hyemoschus aquaticus* in Gabon (collected by G. Dubost). *Bull Mus Nat Hist Natur*. 1974; 135: 75-87.
- Elefant GR, Roldán WH, Seeböck A, Kosma P. Evaluation of a di-O-methylated glycan as a potential antigenic target for the serodiagnosis of human toxocariasis. *Parasite Immunol*. 2016; 38: 236-43.
- Epe C, Sabel T, Schnieder T, Stoye M. The behavior and pathogenicity of *Toxocara canis* larvae in mice of different strains. *Parasitol Res*. 1994; 80: 691-5.
- Fan CK, Holland CV, Loxton K, Barghouth U. Cerebral toxocariasis: silent progression to neurodegenerative disorders? *Clin Microbiol Rev*. 2015; 28: 663-86.
- Feldman GJ, Parker HW. Visceral larva migrans associated with the hypereosinophilic syndrome and the onset of severe asthma. *Ann Intern Med*. 1992; 116: 838-40.
- Fernández-Britto JE, Lopez-Hidalgo GA, Sitchao N. Larva migrans visceral. Reporte de siete casos del hospital militar escuela "Dr. Carlos J. Finlay". *Rev Cubana Med Trop*. 1974; 26: 1-2.
- Finsterner J, Auer H. Neurotoxocarosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2007; 49: 279-87.
- Fogt-Wyrwas R, Jarosz W, Mizgajska-Wiktor H. Utilizing a polymerase chain reaction method for the detection of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs in soil. *J Helminthol* 2007; 81: 75-8.

- Fong MY, Lau YL, Init I, Jamaiah I, Anuar AK, Rahmah N. Recombinant expression of *Toxocara canis* excretory-secretory antigen TES-120 in *Escherichia coli*. *The Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2003; 34: 723-6.
- Gibbons LM, Jacobs DE, Sani RA. *Toxocara malaysiensis* sp. (Nematoda: Ascaridoidea) from domestic cat (*Felis catus*, Linnaeus 1758). *J Parasitol*. 2001; 87: 660–5.
- Gillespie SH. The epidemiology of *Toxocara canis*. *Parasitol Today*. 1988; 4: 180-2.
- Glickman LT, Magnaval JF. Zoonotic roundworm infections. *Infect Dis Clin North Am*. 1993; 7: 717-32.
- Guardis MV, Radman NE, Burgos L, Fonrouge RD, Archelli SM. *Toxocara canis*: migración larval y eosinofilia en el hospedador paraténico. *Parasitol Latinoam*. 2002; 57: 46-9.
- Hamilton CM, Stafford P, Pinelli E, Holland CV. A murine model for cerebral Toxocariasis: characterization of host susceptibility and behaviour. *Parasitology*. 2006; 132: 791-801.
- Harris N, Gause WC. To B or not to B: B cells and Th2-type immune response to helminths. *Trends Immunol*. 2011; 32: 80-8.
- Havasiová-Reiterová K, Tomasovicová O, Dubinsky P. Effect of various doses of infective *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs on the humoral response and distribution of larvae in mice. *Parasitol Res*. 1995; 81: 13–7.
- Hernández-Merlo RH, Núñez FA, Pelayo-Durán LP. Potencial zoonótico de las infecciones por helmintos intestinales en perros callejeros de la Ciudad de La Habana. *Rev Cubana Med Trop*. 2007; 59: 234-40.
- Heuer L, Haendel S, Beineke A, Strube C. Effects of *Toxocara* larvae on brain cell survival by *in vitro* model assessment. *Parasitology*. 2015; 142: 1326-34.
- Ho TT, Tury E, Kobulej T. *Toxocara canis*: 2nd stage larva in the mice. *Parasitol Hungarian*. 1974; 7: 969-84.
- Holland C, O'Connor P, Taylor MRH, Hughes G, Girdwood RWA, Smith H. Families, parks, gardens and Toxocariasis. *Scand J Infect Dis*. 1991; 23: 225-31.

- Holland CV, Cox DM. *Toxocara* in the mouse: a model for parasite-altered host behaviour? . J Helminthol. 2001; 75: 125-35.
- Holland CV, Hamilton C. The significance of cerebral Toxocariasis. In: Holland CV, Smith HV, ed: *Toxocara: the enigmatic parasite*. Oxfordshire, UK: CABI publishing. 2006; 58-73.
- Hotez PJ, Wilkins PP. Toxocariasis: America's Most Common Neglected Infection of Poverty and a Helminthiasis of Global Importance? PLoS Negl Trop Dis. 2009; e400. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000400>
- Hotez PJ. *Toxocara canis*. In: Burg FD, Wald ER, Ingelfinger JR, Polin PA. Ed. Gellis and Kaganis Current Pediatric Therapy. 15th ed. W.B. Saunders Pubs., Philadelphia. 1999; 683–4.
- Hotez PJ. Visceral and ocular larva migrans. Semin Neurol. 1993; 13: 175-9.
- Huang L, Muyldermans S, Saerens D. Nanobodies®: proficient tools in diagnostics. Expert Rev Mol Diagn. 2010; 10: 777–85.
- Inoue K, Inoue Y, Arai T, Nawa Y, Kashiwa Y, Yamamoto S, *et al.* Chronic eosinophilic pneumonia due to visceral larva migrans. Intern Med. 2002; 41: 478-82.
- Ishiyama y col, Ishiyamna S, Ono K, Rai SK, Uga S. Method for detecting circulating *Toxocara canis* antigen and its application in human serum samples. Nepal Med Col J. 2009; 11: 9–13.
- Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. Crit Rev Immunol. 2012; 32: 23- 63.
- Janecek E, Beineke A, Schnieder T, Strube C. Neurotoxocarosis: marked preference of *Toxocara canis* for the cerebrum and *T. cati* for the cerebellum in the paratenic model host mouse. Parasit Vectors. 2014; 7: 194.
- Katsutoshi Y, Kobayashi F, Jun-ichi S, Masahiko U, Moriyasu T. Sandwich Elisa detection of excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* larvae using a specific monoclonal antibody. Southeast Asian. J Trop Med Public Health. 2002; 33: 33-7
- Kayes SG, Oaks JA. Development of the granulomatous response in murine toxocariasis. Initial events. Am J Pathol. 1978; 93: 277–94.

Kayes SG, Oaks JA. Effect of inoculum size and length of infection on the distribution of *Toxocara canis* larvae in the mouse. *Am J Trop Med Hyg.* 1976; 25: 573-80.

Kayes SG, Omholt PE, Grieve RB. Immune responses of CBA/J mice to graded infections with *Toxocara canis*. *Infect Immun.* 1985; 48: 697–703.

Kayes SG. Human toxocariasis and the visceral larva migrans syndrome: correlative immunopathology. *Chem Immunol.* 1997; 66: 99–124.

Kraus A, Valencia X, Cabral AR, de la Vega G. Visceral larva migrans mimicking rheumatic diseases. *J Rheumatol.* 1995; 22: 497-500.

Krotten A, Toczylowski K, Oldak E, Sulik A. Toxocarosis in children: poor hygiene habits and contact with dogs is related to longer treatment. *Parasitol Res.* 2018; 117: 1513-9.

Kuroda E, Yoshida Y, En Shan B, Yamashita U. Suppression of macrophage interleukin-12 and tumour necrosis factor-alpha production in mice infected with *Toxocara canis*. *Parasite Immunol.* 2001; 23: 305–311.

Laird RM, Carballo-Arietta D, Reyes-Zamora EM, García-Roche R, Prieto-Diaz V. *Toxocara* sp. en parques y zonas públicas de Ciudad de La Habana. *Rev Cub Hig Epidemiol.* 2000; 38: 112-6.

Lamina J. Migratory pathway of *Toxocara canis* in paratenic hosts. *Z Parasitenkd* 1964; 24: 600–2.

Lee HF. Effects of superinfection on the behavior of *Toxocara canis* larvae in mice. *J Parasitol.* 1960; 46: 583-8.

Lescano SA, Santos SV, Assis JM, Chieffi PP. Efficacy of nitazoxanide against *Toxocara canis*: larval recovery and humoral immune response in experimentally infected mice. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2015; 57: 337-41.

Li MW, Lin RQ, Chen HH, Sani RA, Song HQ, Zhu XQ. PCR tools for the verification of the specific identity of ascaridoid nematodes from dogs and cats. *Mol. Cell. Probes.* 2007; 21: 349–54.

Lloyd S. *Toxocara canis*: the dog. In: Lewis JW, Maizels RM, eds., *Toxocara* and Toxocariasis: Clinical, Epidemiological and Molecular Perspectives. Institute of Biology: London. 1993; 11-24.

Ma Guangxu, Holland Celia V, Wang Tao, Hofmann Andreas, Fan Chia-Kwung, Maizels Rick M, Hotez Peter J, Gasser Robin B. Human toxocariasis. *Lancet Infect Dis* [revista en Internet] 2017. [acceso 19 de septiembre de 2018]; [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30331-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30331-6)

Macchioni GA. New species *Toxocara lynx*, in the caracal (*Lynx caracal*). *Parassitologia*. 1999; 41: 529–32.

Macuhova K, Kumagai T, Akao N, Ohta N. Loop-mediated isothermal amplification assay for detection and discrimination of *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs directly from sand samples. *J Parasitol*. 2010; 96: 1224–7.

Magnaval JF, Glickman LT, Dorchie P, Morassin B. Highlights of human Toxocariasis. *Korean J Parasitol*. 2001; 39: 1–11.

Magnaval JF, Michault A, Calon N, Charlet J P. Epidemiology of human Toxocariasis in La Reunión. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1994; 88: 531–3.

Magnaval JF, Dorchie P, Glickman LT. *Toxocara* species (Toxocariasis). In: Yu VL y col Eds., *Antimicrobial Therapy and Vaccines*. 2005. Vol. I. 2nd ed. ESun Technologies LLC, Pittsburgh, PA, USA.

Maguire AM, Zarbin MA, Connor TB, Justin J. Ocular penetration of thiabendazole. *Arch Ophthalmol*. 1990; 108: 1675.

Maizels RM, Yazdanbakhsh M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3: 733–44.

Mikulecky MJ, Mikulecky MD. A biometrical view on chemotherapy of Toxocariasis. *Acta Paediatr*. 1994; 83: 1232.

- Minvielle M, Niedfeld M, Ciarmela M, Basualdo J. Toxocariosis causada por *Toxocara canis*: aspectos clínico-epidemiológicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1999; 17: 300-6.
- Mohamad S, Azmi NC, Noordin R. Development and evaluation of a sensitive and specific assay for diagnosis of human Toxocariasis by use of three recombinant antigens (TES-26, TES-30USM, and TES-120). *J Clin Microbiol*. 2009; 47: 1712-7.
- Morais FB, Maciel AL, Arantes TE, Muccioli C, Allemann N. Ultrasonographic findings in ocular toxocariasis. *Arq Bras Oftalmol*. 2012; 75: 43-7.
- Nadler SA, Hudspeth DSS. Phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda:Ascaridida) based on three genes and morphology: hypothesis of structural and sequence evolution. *J Parasitol*. 2000; 86: 380–93.
- Naidu TSV. Two new ascarid nematodes from vertebrate host from India. *Folia Parasit* 1981; 28: 327-34.
- Nestor J, Pasamonte L, Marinconz R, De Marzi M, Cajal S, Malchiodi E. Parasitosis zoonóticas transmitidas por perros en el Chaco Salteño. *Med- Buenos Aires*. 2000; 60: 217-20.
- Nichols RL. The etiology of visceral larva migrans II. Comparative larval morphology. *J Parasitol*. 1956; 42: 363-99.
- Ollero MD, Fenoy S, Cuéllar C, Guillén JL, Del Águila C. Experimental toxocariosis in BALB/c mice: effect of the inoculation dose on brain and eye involvement. *Acta Trop*. 2008; 105: 124-30.
- Othman AA. Therapeutics battle against larval toxocaraisis: Are we still far behind? *Acta Trop*. 2012; 124: 171-8.
- Othman AA, El-Shourbagy SH, Soliman RH. Kinetics of Foxp3-expressing regulatory cells in experimental *Toxocara canis* infection. *Experimental Parasitology* 2011; 127: 454–9.
- Overgaauw PAM, Van Zutphen L, Hoek D, Yaya FO, Roelfsema J, Pinelli E, *et al*. Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and cats in The Netherlands. *Vet Parasitol*. 2009; 163: 115–22.

Parsons JC. Ascarid infections of cats and dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1987; 17: 1307-39.

Pawlowski Z. Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. *J Helminthol.* 2001; 75: 299-305.

Pérez-Salvador EDF, García-Gallardo MV, Locutura-Pérez J, Román-Rodríguez MA. Granuloma posterior como manifestación de toxocariasis ocular. *Rev Mex de Oftalmol.* 2011; 85: 201-4.

Piergili Fioretti D, Moretti A, Mughetti L, Bruschi F. Eosinophilia, granuloma formation, migratory behaviour of second stage larvae in murine *Toxocara canis* infection. Effect of the inoculum size. *Parassitologia.* 1989; 31: 153–66.

Pinelli E, Dormans J, Fonville M, van der Giessen J. A comparative study of Toxocariasis and allergic asthma in murine models. *J Heminthol.* 2001; 75: 137-40.

Pinelli E, Withagen C, Fonville M, Verlaan A, Dormans J, van Loveren H, *et al.* Persistent airway hyper-responsiveness and inflammation in *Toxocara canis*- infected BALB/c mice. *Clin Exp Allergy.* 2005; 35: 826-32.

Pinelli E, Brandes S, Dormans J, Fonville M, Hamilton CM, van der Giessen J. *Toxocara canis*: effect of inoculum size on pulmonary pathology and cytokine expression in BALB/c mice. *Exp Parasitol.* 2007; 115: 76-82.

76–82. Rai SK y col. Use of polymerase chain reaction in the diagnosis of Toxocariasis: an experimental study. *Asian J Trop Med Public Health.* 1997; 28: 541–4.

Resende NM, Gazzinelli-Guimarães PH, Barbosa FS, Oliveira LM, Nogueira D. New insights into the immunopathology of early *Toxocara canis* infection in mice. *Parasit Vectors.* 2015; 8: 354.

Robertson BD, Burkot TR, Gillespie SH, Kennedy MW, Wambai Z, Maizels RM. Detection of circulating parasite antigen and specific antibody in experimental *Toxocara canis* infection. *Clin Exp Immunol.* 1988; 74: 236-41.

Rodrigues e Fonseca G, Vieira dos Santos S, Chieffi PP, Martins de Paula F, Cesar Borges Gryscek R, Zevallos Lescano SA. Experimental toxocariasis in BALB/c mice: relationship between parasite inoculum and the IgG immune response. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2017; 112: 382-6.

Rodríguez-Caballero A, Luna-Ochoa RI, Ponce-Macotela M, Peralata-Abarca GE, Martínez-Gordillo MN. A simple and inexpensive in vitro method for retrieving fertilized *Toxocara canis* eggs. Parasitol Res. 2007; 101: 829–832.

Rodríguez-Caballero A, Martínez-Gordillo MN, Caballero-Salazar S, Rufino-González Y, Ponce-Macotela M. *Toxocara canis*: Analysis of the kinetics of antigen release and antibody production in an in vivo model for the detection of past or present infection. Vet. Parasitol. 2017; 243: 183-7.

Rodríguez-Caballero A, Martínez-Gordillo MN, Medina-Flores Y, Medina-Escutia ME, Meza-Lucas A, Correa D, *et al.* Successful capture of *Toxocara canis* larva antigens from human serum samples. Parasit Vectors. 2015; 8: 264.

Rubinsky-Elefant G, Hirata CE, Yamamoto JH, Ferreira MU. Human Toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. Ann Trop Med Parasitol. 2010; 104: 3-23.

Sánchez SS, García HH and Nicoletti A. Clinical and Magnetic Resonance Imaging Findings of Neurotoxocariasis. Front Neurol. 2018; 9: e53. doi: 10.3389/fneur.2018.00053.

Sariego I, Kanobana K, Rojas L, Speybroeck N, Polman K. Toxocariasis in Cuba: A Literature Review. PLoS Negl Trop Dis 2012; 6: e1382. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001382>

Sariego I, Kanobana K, Junco R, Vereecken K, Núñez FA, Polman K, y col. Frequency of antibodies to *Toxocara* in Cuban schoolchildren. Trop Med Int Health. 2012; 17: 711-4.

Schantz P. Toxocariasis: The Veterinarian's role in prevention of zoonotic transmission. En: Holland CV, Smith HV, Eds. *Toxocara: The enigmatic parasite*. Oxfordshire, UK: CABI Publishing. 2006: 253-9.

Schantz PM, Glickman LT. Toxocaral visceral larva migrans. N Engl J Med. 1978; 298: 436-9.

Schnieder T, Laabs EM, Welz C. Larval development of *Toxocara canis* in dogs. Vet Parasitol. 2011; 175: 193–206.

Serrano MM, Chávez AV, Casa EA. Contaminación de parques públicos del cono este con huevos de *Toxocara* spp. Rev Inv Vet Peru. 2000; 11: 82-8.

Skrjabin KI, Shikhobalova NP, Mozgovoi AA, Skrjabin, KI. Oxyurata and Ascaridata. In: Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates: Supplementary volume. Moscow. 1991. Vol. 2: Akad. Nauk. SSSR.

Smith H, Holland C, Taylor M, Magnaval JF, Schantz P, Maizel R. How common is human Toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. Trends Parasitol. 2009; 25: 182-8.

Smith H, Noordin R. Diagnostic limitations and future trends in the serodiagnosis of human toxocariasis. In: Holland CV, Smith HV, Eds. *Toxocara: The enigmatic parasite*. Oxfordshire Wallingford, UK: CABI Publishing; 2006: 89-112.

Sprent JF. On the migratory behavior of the larvae of various *Ascaris* species in white mice I. Distribution of larvae in tissues. J Infect Dis. 1952; 90: 165–76.

Sprent JFA. On the invasion of the central nervous system by nematodes. II. Invasion of the nervous system in ascariasis. Parasitology. 1955; 45: 41-55.

Stensvold CR, Skov J, Moller LN, Jensen PM, Kapel CMO, Petersen E, *et al.* Seroprevalence of human Toxocariasis in Denmark. Clin Vaccine Immunol. 2009; 16: 1372–3.

Stephen G. Kayes. Inflammatory and Immunological Responses to *Toxocara canis*. In: Holland CV, Smith HV, Eds. *Toxocara: The enigmatic parasite*. Oxfordshire, UK: CABI Publishing; 2006: 158-73.

Strube C, Heuer L, Janecek E. *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. Vet Parasitol. 2013; 193: 375-89.

Sugane K, Oshima T. Induction of peripheral blood eosinophilia in mice by excretory and secretory antigen of *Toxocara canis* larvae. J Helminthol. 1984; 58: 143-7.

Summer B, Cypess RH, Dolinsky ZS, Burright RG, Donovan PJ. Neuropathological studies of experimental Toxocariasis in lead exposed mice. Brain Research Bulletin. 1983; 10: 547-50.

Sun-Young Yoon, Seunghee Baek, So Y. Park, Bomi Shin, Hyouk-Soo Kwon, You S. Cho, Hee-Bom Moon, Tae-Bum Kim. Clinical course and treatment outcomes of toxocariasis-related eosinophilic disorder. Medicine [revista en Internet] (2018) [acceso 09/18/2018]; 97:37. Disponible en <https://journals.lww.com/md-journal>.

Takayanagi TH, Akao N, Suzuki R, Tomoda M, Tsukidate S, Fujita, K. New animal model for human ocular Toxocariasis: ophthalmoscopic observation. Br J Ophthalmol. 1999; 83: 967–72.

Taylor MRH, Keane CT, O'Connor P, Mulvihill E, Holland C. The expanded spectrum of toxocaral disease. Lancet. 1988; 1: 692-4.

Vidal JE, Sztajn bok J, Seguro AC. Eosinophilic meningoencephalitis due to *Toxocara canis*. Case report and review of literature. Am J Trop Med Hyg. 2003; 69: 341–3.

Walsh SS, Robson WJ, Hart CA. Acute transient myositis due to *Toxocara*. Arch Dis Child. 1988; 63: 1087-8.

Wang MQ, Jiang HJ, Inoue H, Myozaki M, Yamashita U. B cell mitogenic activity of *Toxocara canis* adult worm antigen. Parasite Immunol. 1995; 17: 609–15.

Wisniewska-Ligier M, Wozniakowska-Gesicka T, Sobolewska-Dryjanska J, Markiewicz-Jozwiak A, Wieczorek M. Analysis of the course and treatment of toxocariasis in children—a long-term observation. Parasitol Res. 2012; 110: 2363-71.

Wolfrom E, Chêne G, Boisseau H, Beylot C, Géniaux M, Taïeb A. Chronic urticaria and *Toxocara canis*. Lancet. 1995; 345: 196.

Yamasaki H, Araki K, Lim PK, Zasmy N, Mak JW, Taib R, et al. Development of a highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larva excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human Toxocariasis. J Clin Microbiol. 2000; 38: 1409-13.

Zibaei M, Abdollahpour F, Birjandi M, Firoozeh F. Soil contamination with *Toxocara* spp. eggs in the public parks from three areas of Khorram Abad, Iran. Nepal Med Coll J. 2010; 12: 63–5.