



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

“INTERACCIONES NEUROINMUNOENDÓCRINAS DURANTE LA
TOXOCARIOSIS POR *Toxocara canis*: EL PAPEL DE LA PROLACTINA”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

VÍCTOR HUGO DEL RÍO ARAIZA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Jorge Morales Montor

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

COMITÉ TUTORAL

Dr. Fernando Alba Hurtado

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM

Dra. Karen Elizabeth Nava Castro

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

MÉXICO, D.F.

ENERO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

Con cariño, respeto y admiración a mi padre José Gregorio del Río Pacheco y a mi madre Ana Belia Araiza Monreal, por haberme dado la vida y siempre brindarme su amor y apoyo. Por darme todos esos consejos que me han hecho una mejor persona, esta tesis pertenece a ambos. Los amo, gracias por todo.

A mis hermanas Zarina, Claudia y Gabriela que a pesar de los problemas que podamos llegar a tener siempre me han brindado su cariño y confianza.

A todos mis tíos(as) que siempre me han apoyado y estimulado a superarme.

A todos mis primos(as), los quiero muchísimo y agradezco tener una familia tan unida tanto en las buenas como en las malas.

A mi novia, Nashla Yazmín Pérez Sánchez, a quien tuve el placer de conocer al entrar a la maestría. Gracias por todo el amor y apoyo que me has brindado durante este tiempo. Te quiero con todo mí ser.

A la familia Arellano Martín del Campo a la cual tengo la fortuna de conocer desde que tengo 5 años y que siempre me han tratado y recibido como un miembro más de su familia y a la cual pertenece mi gran hermano Francisco Arellano Martín del Campo, gracias mi hermano por estar siempre a mi lado y por todos esos grandes momentos que hemos pasado juntos.

A todos mis amigos que tuve el placer de conocer y convivir a lo largo de toda la carrera, Marcos, Ricardo, Mateo, Agustín, Miguel, etc. faltan muchos por mencionar pero a todos les deseo lo mejor del mundo y mucho éxito profesional.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Paul, Hugo, Marisa, Ricardo, Rosalía, Itztli, Armando, Tania, Elizabeth, Angélica, Ana, Lorena, Nelly, Cristian, etc. que me brindaron su amistad y su apoyo a lo largo de mis estudios de maestría. Gracias por todo el apoyo y por brindarme su amistad.

A mis demás amigos y hermanos, Jorge, Luis, Mario, Octavio, Karen, Karla, etc. con los cuales sé que siempre voy a contar y siempre me han brindado su amistad, cariño y confianza. Los quiero mucho a todos, gracias por aguantarme en las buenas y en las malas.

Finalmente a todos aquellos que fueron y que son parte importante en mi vida, los llevo en mi corazón, a todos mil gracias!!!!

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Morales Montor, por darme la oportunidad de integrarme a su grupo de trabajo y darme todo su tiempo y apoyo para la realización del proyecto no solo como tutor, sino también como amigo.

Al Dr. Fernando Alba Hurtado, por todos los consejos y la orientación que me brindo para la realización del proyecto.

A la Dra. Karen Elizabeth Nava Castro, por brindarme su amistad y su apoyo para realizar las pruebas de citometría de flujo y por la orientación brindada para la finalización del proyecto.

Al Dr. Andrés Quintanar Stephano, por todos los consejos y el apoyo brindado para la realización de las cirugías.

Al Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán, por la asesoría brindada para la realización de las ELISAS para la determinación de los antígenos del parásito, además de por el tiempo invertido en la revisión de la tesis de grado.

Al Dr. Hugo Aguilar Díaz por ser mi amigo, por ayudarme al momento de realizar los procedimientos experimentales, y por el tiempo brindado para realizar la revisión de la tesis de grado.

A los miembros restantes de mi jurado de examen de grado; Dra. Yazmín Alcalá Canto y al Dr. Pedro Ostoa Saloma, gracias por sus observaciones, críticas y por todo su apoyo.

A la Biol. Lorena López Griego, técnico académico del laboratorio del Dr. Jorge Morales Montor, por todos los consejos y el apoyo brindado para la realización de distintos procedimientos experimentales.

A todos mis compañeros del laboratorio, por el apoyo brindado al momento de realizar los experimentos.

Al PAEP por el apoyo brindado para asistir al curso de “microcirugía experimental en la rata”.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y Salud Animal y al Instituto de Investigaciones Biomédicas.

A la UNAM la máxima casa de estudios, por abrirme las puertas y permitirme ser parte de la comunidad universitaria.

RESUMEN

DEL RÍO ARAIZA VÍCTOR HUGO. “Interacciones neuroinmunoendócrinas durante la toxocariosis por *Toxocara canis*: El papel de la prolactina”

Toxocara canis es el helminto nemátodo causante de la toxocariosis, enfermedad parasitaria de importancia médico-veterinaria. Dentro del ciclo de vida del parásito, se ha mencionado que la prolactina (PRL) es la hormona responsable de la reactivación y migración de las larvas hacia el útero y la glándula mamaria, durante el último tercio de la gestación. En el presente trabajo, se evaluó el efecto de la PRL sobre la reactivación de la larva somática de *T. canis*, aunado al estudio de los porcentajes de subpoblaciones del sistema inmune a cargo de la eliminación del parásito, así como sobre la expresión del receptor de PRL sobre esas mismas células en un modelo murino durante la infección crónica. Para ello, se utilizaron ratas macho hipoprolactinémicas e hiperprolactinémicas a las cuales se les determinaron las cargas parasitarias en distintos órganos (glándula mamaria, pulmón y cerebro). Además, se analizaron los títulos de anticuerpos específicos en suero y las diferencias histológicas en los infiltrados inflamatorios en pulmón, hígado y riñón. Adicionalmente, también se evaluaron los porcentajes de células del sistema inmunológico y la expresión relativa del receptor de PRL en las mismas. No se recuperaron larvas de la glándula mamaria en ninguno de los grupos experimentales, y solo hubo una disminución en el número de larvas recuperadas de los pulmones en las ratas hipofisectomizadas ($P < 0.001$). En cuanto a la determinación de anticuerpos específicos contra el parásito, se observa que existe producción de anticuerpos específicos en todos los grupos infectados, menos en los animales hipofisectomizados ($P < 0.001$). En la evaluación de los procesos inflamatorios, a nivel pulmonar se observaron los típicos granulomas eosinofílicos que se presentan durante la infección crónica en todos los grupos experimentales. Por el caso contrario, dichas lesiones solo se presentaron en el hígado y el riñón de las ratas intactas. Los hallazgos de la participación de la PRL y la infección sobre las células del sistema inmunológico y la expresión del receptor de PRL difirieron dependiendo del tipo de cirugía a la cual fueron sometidas las ratas. En conclusión, la PRL por sí sola no fue capaz de generar la reactivación y migración de las larvas somáticas de *Toxocara canis*.

ABSTRACT

DEL RÍO ARAIZA VÍCTOR HUGO "Neuroimmunoendocrine interactions during toxocariosis by *Toxocara canis*: The role of prolactin"

Toxocara canis is the worm nematode that causes toxocariosis, a parasitic disease of medical and veterinary relevance. Within the life cycle of the parasite, it has been mentioned that prolactin (PRL), is the responsible hormone for reactivation and larval migration to the uterus and mammary gland, during the last third of gestation in mammals. In this dissertation, the effect of PRL on this phenomenon, and on the percent of immune cells in charge of controlling and eliminating the parasite, as well as the specific expression of RPRL on these cells, in a chronic infection rat model, was evaluated. In order to do this, hypoprolactinemic and hyperprolactinemic male rats, infected or not, were used. In these groups, it were determined the parasite load in different organs (breast, lung and brain), the specific antibody titers in serum and the histological differences in the inflammatory infiltrates in lung, liver and kidney. Additionally, the percentages of cells of the immune system in charge of elimination of the parasite, and the relative PRL receptor expression in the same cells, were also evaluated. Our results showed that no larvae were recovered neither in the mammary gland or in any of the other tissues analyzed in all the experimental groups. However, there was only a decrease in the number of larvae recovered from the lungs in hypophysectomized rats ($P < 0.001$). As for the determination of specific antibodies against the parasite, specific antibodies were detected in serum of all infected groups, except in the hypophysectomized animals ($P < 0.001$). The evaluation of the inflammatory processes in the lung, showed a eosinophilic granuloma, which is presented during chronic infection in all experimental groups. On the contrary, injury is presented only in the liver and kidney of intact rats. Our findings, involving PRL and infection, on the PRL receptor expression on immune cells, differed depending on the type of surgery to which rats were subjected. In conclusion, PRL alone was not able to generate the recovery and migration of somatic larvae of *Toxocara canis*, but induced important changes in the percentage of immune cells in different compartments in the rat.

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Otras especies del género <i>Toxocara</i>	2
Cuadro 2. Prevalencia de parásitos adultos de <i>T. canis</i> en distintas partes del mundo.....	15
Cuadro 3. Prevalencia de parásitos adultos de <i>T. canis</i> en distintas partes de México.....	16
Cuadro 4. Grupos experimentales.....	36
Cuadro 5. Material e instrumental para hipofisectomía.....	38
Cuadro 6. Material e instrumental para implante de Adenohipófisis en cápsula renal.....	42

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Microscopía óptica 10x, huevos de <i>T. canis</i>	3
Figura 2. Microscopía óptica 10x, larva infectante de <i>T. canis</i>	4
Figura 3. Adultos de <i>T. canis</i>	4
Figura 4. Ciclo biológico de <i>T. canis</i>	5
Figura 5. Ciclo biológico en cachorros.....	7
Figura 6. Ciclo biológico en perros adultos y hospederos paraténicos.....	8
Figura 7. Parásitos adultos de <i>T. canis</i> en heces.....	13
Figura 8. Respuesta inmune a L2 de <i>T. canis</i>	19
Figura 9. Respuesta por parte del hospedero a larvas de <i>T. canis</i> , actividades anti-inflamatorias, pro-inflamatorias y pro-fibróticas.....	23
Figura 10. Mecanismo de asociación entre la infección por <i>T. canis</i> y el asma alérgica.....	24
Figura 11. Interacción entre el hipotálamo, la adenohipófisis y los tejidos blancos de la PRL en la regulación de la secreción de PRL en mamíferos.....	26
Figura 12. Material e instrumental quirúrgico utilizado para la hipofisectomía....	39
Figura 13. Músculos del cuello y zona de trepanación del cráneo para extirpar la hipófisis.....	40
Figura 14. Vista al exponer la glándula hipófisis.....	41

Figura 15. Instrumental utilizado para realizar trasplantes de adenohipófisis A la cápsula renal.....	43
Figura 16. Implante de adenohipófisis en cápsula renal.....	44
Figura 17. Equipo para realizar la concentración de los AgESTc.....	47
Figura 18. Metodología para la obtención de los distintos órganos y tejidos utilizados para la realización del experimento.....	50
Figura 19. Número total de larvas recuperadas por medio de digestión artificial en pulmón, cerebro y glándula mamaria de ratas macho infectadas con <i>T. canis</i>	51
Figura 20. Porcentaje de linfocitos T totales (CD3+) en bazo, GLP y GLM provenientes de ratas con y sin infección.....	52
Figura 21. Porcentaje de linfocitos T totales (CD3+) RPRL+ e IMF en bazo, GLP y GLM provenientes de ratas con y sin infección.....	55
Figura 22. Porcentaje de linfocitos T cooperadores (CD4+) en bazo, GLP y GLM provenientes de ratas con y sin infección.....	56
Figura 23. Porcentaje de linfocitos T cooperadores (CD4+) RPRL+ e IMF en bazo, GLP y GLM provenientes de ratas con y sin infección.....	59
Figura 24. Porcentaje de linfocitos T citotóxicos (CD8+) en bazo, GLP y GLM provenientes de ratas con y sin infección.....	61

Figura 25. Porcentaje de linfocitos T citotóxicos (CD8+) RPRL+ e IMF en bazo, GLP y GLM provenientes de ratas con y sin infección.....	63
Figura 26. Porcentaje de linfocitos B (CD45+) en bazo, GLP y GLM provenientes de ratas con y sin infección.....	64
Figura 27. Porcentaje de linfocitos B (CD45+) RPRL+ e IMF en bazo, GLP y GLM provenientes de ratas con y sin infección.....	66
Figura 28. Porcentaje de células NK (CD161+) en bazo, GLP y GLM provenientes de ratas con y sin infección.....	68
Figura 29. Porcentaje de células NK (CD161+) RPRL+ e IMF en bazo, GLP y GLM provenientes de ratas con y sin infección.....	70
Figura 30. Porcentaje de células T $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta$ +) en bazo, GLP y GLM provenientes de ratas con y sin infección.....	72
Figura 31. Porcentaje de linfocitos T $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta$ +) RPRL+ e IMF en bazo, GLP y GLM provenientes de ratas con y sin infección.....	74
Figura 32. Títulos de anticuerpos específicos anti- <i>T. canis</i> en ratas macho control e infectadas.....	75
Figura 33. Vista histológica del pulmón en los distintos grupos de ratas infectadas. A. Intactos, B. Sh-Hpx, C. Hpx, D. Sh-HPRL, E. HPRL. 20x.....	77
Figura 34. Vista histológica del hígado en los distintos grupos de ratas infectadas. A. Intactos, B. Sh-Hpx, C. Hpx, D. Sh-HPRL, E. HPRL. 20x.....	79

Figura 35. Vista histológica del riñón en los distintos grupos de ratas infectadas.

A. Intactos, B. Sh-Hpx, C. Hpx, D. Sh-HPRL, E. HPRL. 20x.....81

ÍNDICE

	Página
INTRODUCCIÓN.....	1
1. <i>Toxocara canis</i> (<i>T. canis</i>).....	1
1.1 Clasificación taxonómica.....	1
1.2 Morfología.....	3
1.2.1 Huevos.....	3
1.2.2 Larvas.....	3
1.2.3 Adultos.....	4
1.3 Ciclo de vida.....	5
1.3.1 Ciclo de vida en hospederos definitivos.....	6
a) En cachorros.....	6
b) En perros adultos durante la gestación y la lactancia.....	7
1.3.2 Ciclo de vida en hospederos paraténicos.....	8
2. Toxocariosis.....	9
2.1 Patogenia y lesiones en perros.....	9
2.2 Signos clínicos en perros.....	10
2.3 Cuadro clínico en humanos.....	10
2.3.1 <i>Larva Migrans Visceral</i> (LMV).....	10
2.3.2 <i>Larva Migrans Ocular</i> (LMO).....	11
2.3.3 Toxocariosis Neurológica (TN).....	11
2.3.4 Toxocariosis Encubierta (TE).....	12
2.3.5 Toxocariosis Asintomática (TA).....	12
2.4 Diagnóstico.....	12
2.4.1 Diagnóstico en hospederos definitivos.....	12
2.4.2 Diagnóstico en el suelo.....	13
2.4.3 Diagnóstico en hospederos paraténicos.....	14
2.5 Epidemiología.....	14

3. Antígenos de Excreción y Secreción de <i>T. canis</i> (AgESTc).....	17
4. Respuesta inmunológica a <i>T. canis</i>	18
4.1 Respuesta inmune humoral.....	20
4.2 Eosinofilia.....	20
4.3 Consecuencias de la activación hiperinmune durante la infección: <i>T. canis</i> y asma.....	21
5. Prolactina (PRL).....	25
5.1. Receptores de PRL (RPRL).....	25
5.2. Regulación de la secreción de PRL hipofisiaria.....	26
5.3. PRL y sistema inmunológico.....	27
6. La red neuroinmunoendócrina en las enfermedades parasitarias.....	28
6.1 Hormonas esteroideas y enfermedades parasitarias.....	29
6.2 PRL y enfermedades parasitarias.....	31
 JUSTIFICACIÓN.....	 33
 HIPÓTESIS.....	 34
 OBJETIVOS.....	 35
1. Objetivo general.....	35
2. Objetivos específicos.....	35
 MATERIAL Y MÉTODOS.....	 36
1. Localización.....	36
2. Animales y alimentación.....	36
3. Obtención y procesamiento de los huevos de <i>T. canis</i>	37
4. Infecciones de las ratas.....	37
5. Procedimientos quirúrgicos.....	38
5.1 Hipofisectomía.....	38
5.1.1 Material e instrumental.....	38

5.1.2 Manejo preoperatorio.....	39
5.1.3 Cirugía.....	39
5.1.4 Cuidados postoperatorios.....	42
5.2 Implante de adenohipófisis en cápsula renal.....	42
5.2.1 Material e instrumental.....	42
5.2.2 Manejo preoperatorio.....	43
5.2.3 Cirugía.....	43
5.2.4 Cuidados postoperatorios.....	44
5.3 Cirugía simulada (Sham) de hipofisectomía.....	44
5.4 Cirugía simulada (sham) de implante de adenohipófisis en cápsula renal.....	45
6. Toma y procesamiento de las muestras.....	45
7. Digestión artificial.....	45
8. Citometría de flujo.....	46
9. Determinación de los niveles séricos de anticuerpos específicos anti- <i>T. canis</i>	47
9.1 Producción de AgEST.....	47
9.2 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	47
9.3 Electroforesis de AgES obtenidos a partir de medios de cultivo de L2 de <i>T. canis</i>	48
9.4 Ensayo inmunoenzimático para la determinación de IgG específica a <i>T. canis</i>	48
10. Procesamiento de órganos para tinción con Hematoxilina-Eosina.....	49
11. Análisis estadístico.....	49
12. Diseño experimental.....	50
 RESULTADOS.....	 51
1. Número total de larvas en pulmón, cerebro y glándula mamaria.....	51
2. Análisis de las subpoblaciones celulares del sistema inmunológico.....	52

2.1 Porcentajes de linfocitos T totales (CD3+) en Bazo, GLP y GLM.....	52
2.1.1 Expresión del RPRL en linfocitos T totales (CD3+) obtenidos de Bazo, GLP y GLM.....	54
2.2 Porcentaje de linfocitos T cooperadores (CD4+) en Bazo, GLP y GLM	56
2.2.1 Expresión del RPRL en linfocitos T cooperadores (CD4+) obtenidos de Bazo, GLP y GLM.....	58
2.3 Porcentaje de linfocitos T citotóxicos (CD8+) en Bazo, GLP y GLM.....	60
2.3.1 Expresión del RPRL en linfocitos T citotóxicos (CD8+) obtenidos de Bazo, GLP y GLM.....	62
2.4 Porcentaje de linfocitos B (CD45+) en Bazo, GLP y GLM.....	64
2.4.1 Expresión del RPRL en linfocitos B (CD45+) obtenidos de Bazo, GLM y GLP.....	65
2.5 Porcentaje de células NK (CD161+) en Bazo, GLP y GLM.....	67
2.5.1 Expresión del RPRL en células NK (CD161+) obtenidas de Bazo, GLM y GLP.....	69
2.6 Porcentaje de linfocitos T $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta$ +) en Bazo, GLP y GLM.....	71
2.6.1 Expresión del RPRL en linfocitos T $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta$ +) obtenidos de Bazo, GLM y GLP.....	73
3. Determinación de títulos de anticuerpos IgG específicos anti- <i>T. canis</i>	75
4. Tinciones con Hematoxilina-Eosina.....	76
4.1 Pulmón.....	76
4.2 Hígado.....	78
4.3 Riñón.....	80
DISCUSIÓN.....	82
CONCLUSIÓN.....	92
BIBLIOGRAFÍA.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS

1. AgESTc..... Antígenos de secreción-excreción de *Toxocara canis*
2. BSA..... Albumina sérica bovina
3. °C..... Grados centígrados
4. DA..... Dopamina
5. Da..... Dalton
6. DHEA..... Dehidroepiandrosterona
7. DO..... Densidad óptica
8. dpi..... Días post-infección
9. GH-R..... Receptor de la hormona de crecimiento
10. GLM..... Ganglios linfáticos mesentéricos
11. GLP..... Ganglios linfáticos periféricos
12. H-E..... Hematoxilina-Eosina
13. HL..... Huevos larvados
14. HPRL..... Animales con implante de adenohipófisis
15. Hpx..... Animales hipofisectomizados
16. IFN- γ Interferón gamma
17. Ig..... Inmunoglobulina
18. IL..... Interleucina
19. IMF..... Intensidad media de fluorescencia

20. L2..... Larva de segundo estadio
21. L3..... Larva de tercer estadio
22. LB..... Linfocitos B
23. LMO..... Larva migrans ocular
24. LMV..... Larva migrans visceral
25. LT..... Linfocitos T
26. LTc..... Linfocitos T citotóxicos
27. LTh..... Linfocitos T cooperadores
28. µg..... Microgramos
29. µl..... Microlitros
30. OPD..... Ortofenilendiamina
31. PBS..... Buffer de fosfatos salino
32. PRL..... Prolactina
33. RPRL..... Receptor de Prolactina
34. rpm..... Revoluciones por minuto
35. Sh-Hpx..... Animales sham de hipofisectomía
36. Sh-HPRL..... Animales sham implante de adenohipófisis
37. SNC..... Sistema nervioso central
38. SSF..... Solución salina fisiológica
39. TA..... Toxocariosis asintomática

- 40. *T. canis*..... *Toxocara canis*
- 41. TE..... Toxocariosis encubierta
- 42. LT $\gamma\delta$ (gd)..... Linfocitos T gamma-delta
- 43. TN..... Toxocariosis neurológica
- 44. Treg..... Células T reguladoras

INTRODUCCIÓN

1. *Toxocara canis* (*T. canis*)

T. canis (Werner, 1782) es el helminto nemátodo causante de la toxocariosis, enfermedad parasitaria de importancia tanto en medicina humana como veterinaria. Este parásito tiene como hospedero definitivo a los perros, zorros, coyotes y lobos (principalmente los cachorros). En México, y en muchas otras partes del mundo, es el helminto más comúnmente encontrado en perros (Cordero *et al.*, 1999). También posee hospederos paraténicos, dentro de los cuales podemos encontrar a la mayoría de los mamíferos (hombre, cerdos, ovejas, rata, ratón, entre otros), aves y además, algunos invertebrados, como las lombrices de tierra y artrópodos como las pulgas (Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2011). Esta helmintiasis es considerada una de las zoonosis con mayor distribución en el mundo, debido a la amplia convivencia que ha generado el hombre con perros y gatos domésticos (Despommier, 2003).

1.1 Clasificación taxonómica

Los miembros del género *Toxocara* son gusanos que presentan dimorfismo sexual, son de color blanquecino con forma cilíndrica y extremos puntiagudos, presentan tres labios y dos aletas cervicales en la parte posterior. Las especies pertenecientes a este género pueden ser distinguidas entre sí teniendo como base la morfología de los labios, las aletas cervicales, la longitud de las espículas y las características del aparato reproductor femenino.

Reino Animalia

Phylum Nematoda

Orden Ascaridida

Superfamilia Ascaridoidea

Familia Toxocaridae

Genero *Toxocara*

Especie *canis*

Cuadro 1. Otras especies del género *Toxocara*

Nombre científico	Autor
<i>Toxocara alienata</i>	Rudolphi, 1819
<i>Toxocara anakumae</i>	Noda, 1966
<i>Toxocara apodemi</i>	Olsen, 1957
<i>Toxocara canarisi</i>	Puylaert, 1967
<i>Toxocara canis</i>	Werner, 1782
<i>Toxocara cati</i>	Schrank, 1788
<i>Toxocara cynonycteridis</i>	Parona, 1889
<i>Toxocara elephantis</i>	Rudolphi, 1819
<i>Toxocara genettae</i>	Warren, 1972
<i>Toxocara hippopotami</i>	Canavan, 1931
<i>Toxocara indica</i>	Naidu, 1981
<i>Toxocara lyncis</i>	Macchioni, 1999
<i>Toxocara mackerrasae</i>	Sprent, 1957
<i>Toxocara malaysiensis</i>	Gibbons, Jacobs & Sani, 2001
<i>Toxocara manzadiensis</i>	Vuylsteke, 1956
<i>Toxocara mystax</i>	Zeder, 1800
<i>Toxocara paradoxura</i>	Kou, 1958
<i>Toxocara pearsei</i>	Chitwood, 1935
<i>Toxocara pteropodis</i>	Baylis, 1936
<i>Toxocara sprenti</i>	Warren, 1972
<i>Toxocara suricattae</i>	Ortlepp, 1940
<i>Toxocara tanuki</i>	Yamaguti, 1941
<i>Toxocara vajrasthira</i>	Sprent, 1972
<i>Toxocara vincenti</i>	Puylaert, 1967
<i>Toxocara vitulorum</i>	Goeze, 1782
<i>Toxocara warreni</i>	Durette-Desset & Chabaud, 1974

Fuente: <http://insects.tamu.edu/research/collection/hallan/Nematoda/Family/Ascarididae.txt>

1.2 Morfología

1.2.1 Huevos

Son de forma oval, miden de 70 a 90 μm aproximadamente, y son de color blanquecino. Presentan tres capas dispuestas en forma concéntrica formando una cubierta gruesa con presencia de fosetas (Alba-Hurtado *et al.*, 1994). Esta característica, les confiere una gran resistencia a agentes físicos, químicos y mecánicos presentes en el ambiente. La primera capa es de origen albuminoso, enseguida y por debajo de ésta, viene la capa quitinosa, y, finalmente, una capa lipóide formada por gránulos refringentes provenientes del citoplasma. Existe una cuarta cubierta formada por la adherencia de las secreciones uterinas del parásito al huevo. Al ser expulsado, el huevo entra en contacto con la bilis del tracto intestinal y esta última capa se endurece confiriéndole un color marrón (Figura 1).

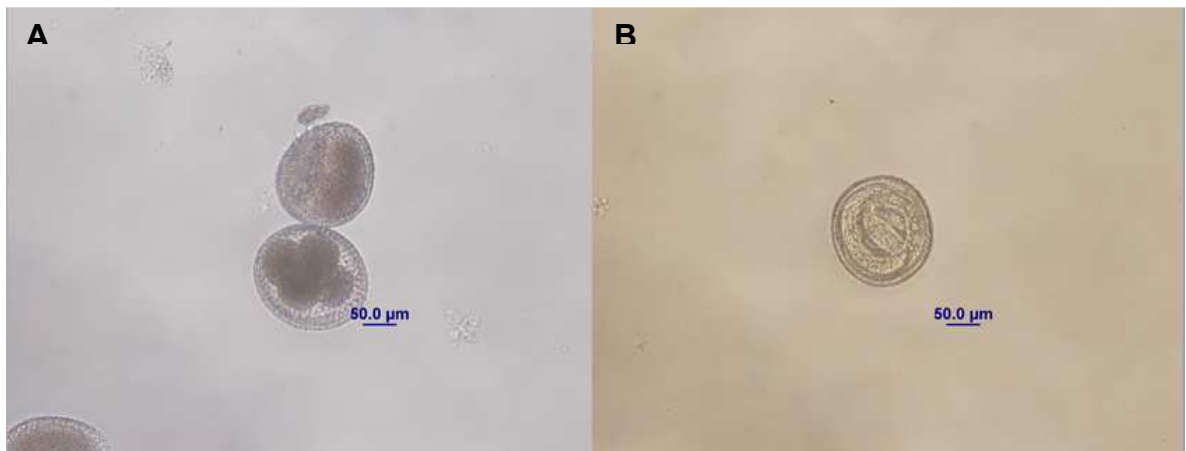


Figura 1. Microscopía óptica 10x, huevos de *T. canis*: A) Huevo sin larva y blastomero B) Huevo larvado.

1.2.2 Larvas

Las larvas de segundo estadio (L2) que se forman dentro del huevo son la fase infectante del parásito (Figura 2). No obstante, algunos autores mencionan que la fase infectante es la larva de tercer estadio, esto debido a la observación de que la larva sufre dos mudas dentro del huevo antes de volverse infectante

(Brunaska *et al.*, 1995). Son de color transparente, tienen una longitud aproximada de 400µm y un diámetro a nivel del esófago de 18 a 21 µm (Nichols, 1956).

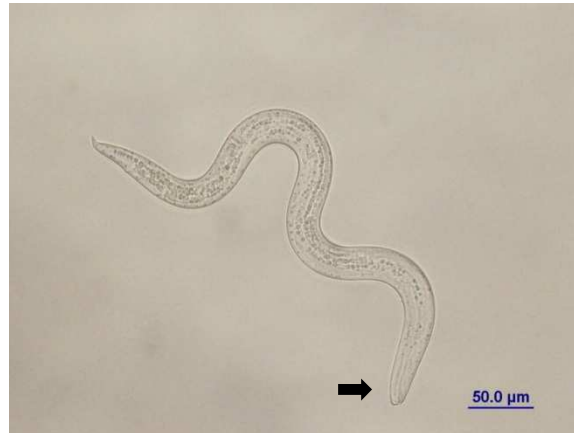


Figura 2. Microscopía óptica 10x, larva infectante de *T. canis*. La flecha negra indica la porción anterior de la larva.

1.2.3 Adultos

T. canis, es un nematodo dimórfico de color blanquecino. Los machos miden de 4 a 10 cm de longitud, y las hembras llegan a medir hasta 18 cm (Figura 3). En la parte anterior, presentan tres labios que no sobresalen del cuerpo. La superficie interna de los labios presenta una cresta dentada o pequeños dientes. Presenta aletas cervicales que le confieren la forma de “punta de flecha”. Los machos terminan en forma enroscada y en la porción ventral presentan dos espículas. En las hembras, la vulva se encuentra en el primer tercio del cuerpo y pueden producir hasta 200,000 huevos al día por hembra grávida pero, estos huevos no están embrionados al momento de salir (Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2011).



Figura 3. Adultos de *T. canis*. Tomado de; <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/larva-migrans-visceral.html>

1.3 Ciclo de vida

La relación existente entre este parásito y sus hospederos es extremadamente compleja. El ciclo de vida (Figura 4) comienza con la eliminación de huevos no larvados en las heces de perros infectados y va a variar dependiendo del tipo de hospedero (definitivo o paraténico), de la edad del hospedero (cachorro o adulto) y del estado fisiológico (gestante o no gestante). En condiciones normales, el desarrollo de la larva infectante requiere de 9 a 11 días a 24°C y de 3 a 5 días a 30°C en presencia de oxígeno y humedad relativa del 75% (Cordero *et al.*, 1999; Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2011).

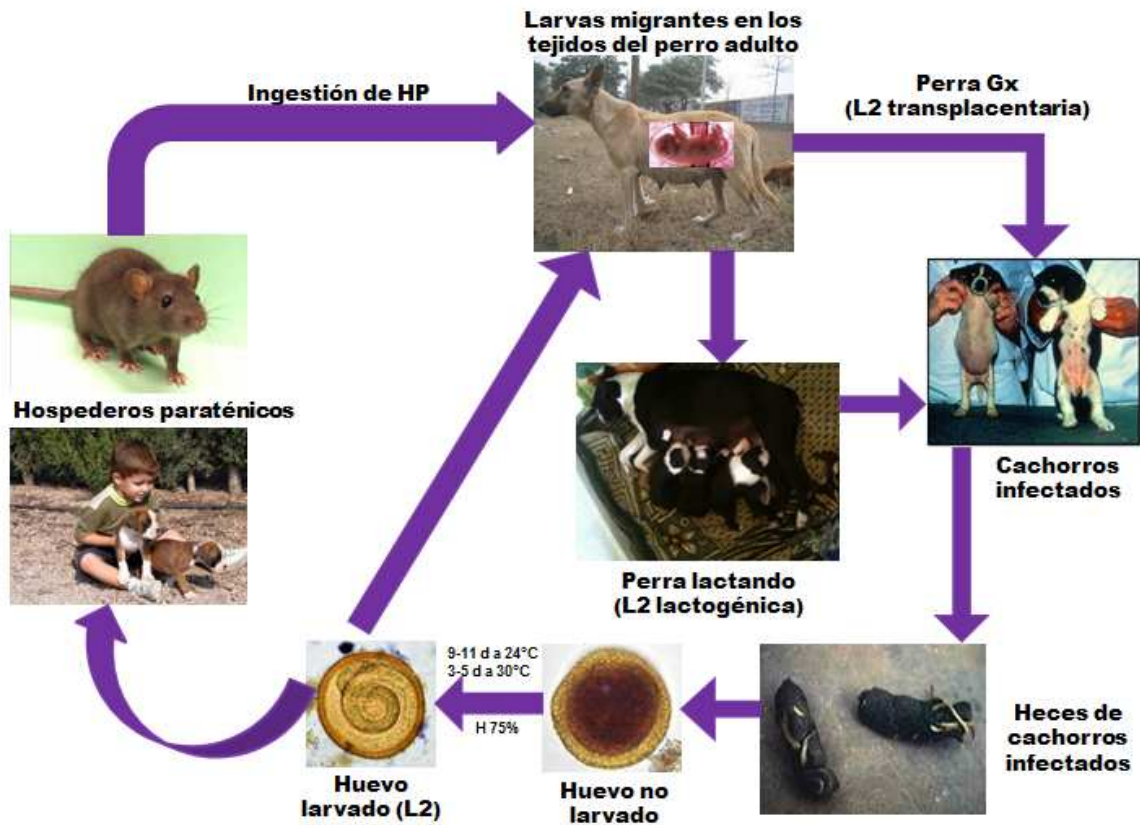


Figura 4. Ciclo biológico de *T. canis*. Desarrollo del huevo larvado infectante (L2), ingestión de huevos por parte de hospederos paraténicos (HP) (rata, humano, etc.) o definitivos (perros), ingestión de HP con larvas somáticas, transmisión de las L2 transplacentaria en hembras gestantes y lactogénica en hembras lactantes.

1.3.1 Ciclo de vida en hospederos definitivos

a) En cachorros

Los cachorros menores de tres meses de edad son los principales portadores de las fases adultas del parásito. El contagio en ellos puede ser por distintas vías: transmisión materna (transplacentaria o lactogénica), o por la ingesta de huevos larvados (HL). La forma de infección más frecuentemente observada en los cachorros es la vía trans-placentaria y se ha observado que las hembras con larvas somáticas pueden infectar a sus cachorros durante varias gestaciones consecutivas (Soulsby, 1983). Cuando los cachorros ingieren HL o larvas presentes en el calostro y la leche, atraviesan la pared intestinal entrando al flujo linfático y por vena porta llegan al hígado dos días después. Posteriormente viajan por vena cava al corazón derecho y por medio de la arteria pulmonar penetran a los pulmones (migración hepato-cardio-pulmonar). Después de permanecer un tiempo en los capilares pulmonares las larvas pasan a los alveolos, migran por la traquea hacia la faringe en donde son redeglutidas (migración traqueal) y se establecen en el estómago. Durante esta migración, la larva sufre una muda y se transforma en larva de tercer estadio (L3). En el estómago, las larvas permanecen un tiempo (aproximadamente hasta el día 10 post-infección) y pasan al duodeno donde ocurre la muda al cuarto y quinto estadio para convertirse en parásitos adultos entre los 19 y 27 días post-infección. Si los cachorros fueron infectados por vía trans-placentaria, las larvas llegan al hígado fetal y se transforman en L3. Al nacimiento, las larvas se encuentran en los pulmones y permanecerán ahí durante la primera semana de vida. La muda hacia el cuarto estadio se puede dar durante la primera o segunda semana de edad y hacia el final de esta semana, mudan al quinto estadio para después convertirse en adultos (Figura 5). En este tipo de transmisión, la eliminación de huevos en heces da inicio a partir de los 15 días de edad. Por otra parte, si la transmisión fue por vía lactogénica, o por ingesta de HL, la eliminación de huevos sucede de 4 a 5 semanas post-infección (Quiroz, 2003; Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2011).

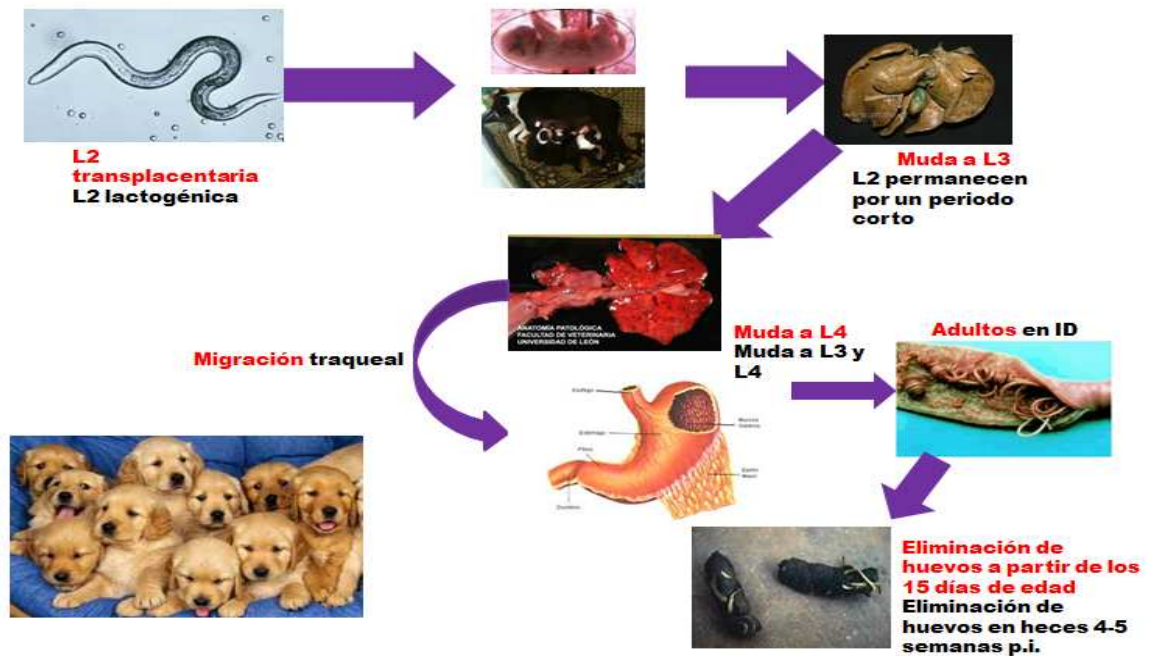


Figura 5. Ciclo biológico en cachorros (transmisión transplacentaria y lactogénica).

b) En perros adultos, durante la gestación y la lactancia

La infección ocurre por dos vías: por la depredación de hospederos paraténicos con larvas somáticas enquistadas; y/o por la ingesta de HL. Al ingerir hospederos paraténicos, las larvas se transforman en adultos sin la necesidad de realizar una migración somática y estos perros tienen la capacidad de eliminar huevos por un corto periodo de tiempo. Por otra parte, si la infección es ocasionada por medio de HL, las larvas eclosionan a nivel intestinal y atraviesan esta pared. Posteriormente, realizan una migración hepato-cardio-pulmonar y regresan al corazón para distribuirse a los distintos órganos y tejidos (principalmente hígado, cerebro, pulmones, riñón y músculo) donde permanecerán como L2 enquistadas (Figura 6). En hembras gestantes, las larvas somáticas sufren un proceso de reactivación, el cual consiste en la migración de las larvas hacia el útero y glándula mamaria. Se ha mencionado que dicho proceso al parecer es desencadenado por el aumento en la concentración de Prolactina (PRL) en sangre (Overgaauw *et al.*, 1998). Actualmente, existen escasos reportes

del papel de la PRL en la infección por *T. canis*, no obstante, un estudio realizado en un modelo murino, sugiere que la reactivación y migración de las larvas somáticas hacia el útero y la glándula mamaria podrían estar desencadenados por un aumento en la concentración de esta hormona, favoreciendo la transmisión transplacentaria y lactogénica a la descendencia (Jin *et al.*, 2008). Con base en lo anterior, podría existir un patrón de reactivación similar en los canidos, donde, el aumento en la concentración de PRL se presenta a partir del último tercio de gestación (día 40-42).

1.3.2 Ciclo de vida en hospederos paraténicos

La infección es hospederos paraténicos es muy similar a la ocurrida en perros adultos, con la diferencia de que no existe desarrollo de parásitos adultos. Las larvas se establecen en los distintos órganos y tejidos donde entran en un estado de latencia y permanecen viables por largos periodos de tiempo esperando a ser ingeridas por un hospedero definitivo (Figura 6), de no ser ingeridas las larvas mueren y se calcifican (Quiroz, 2003; Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2011).

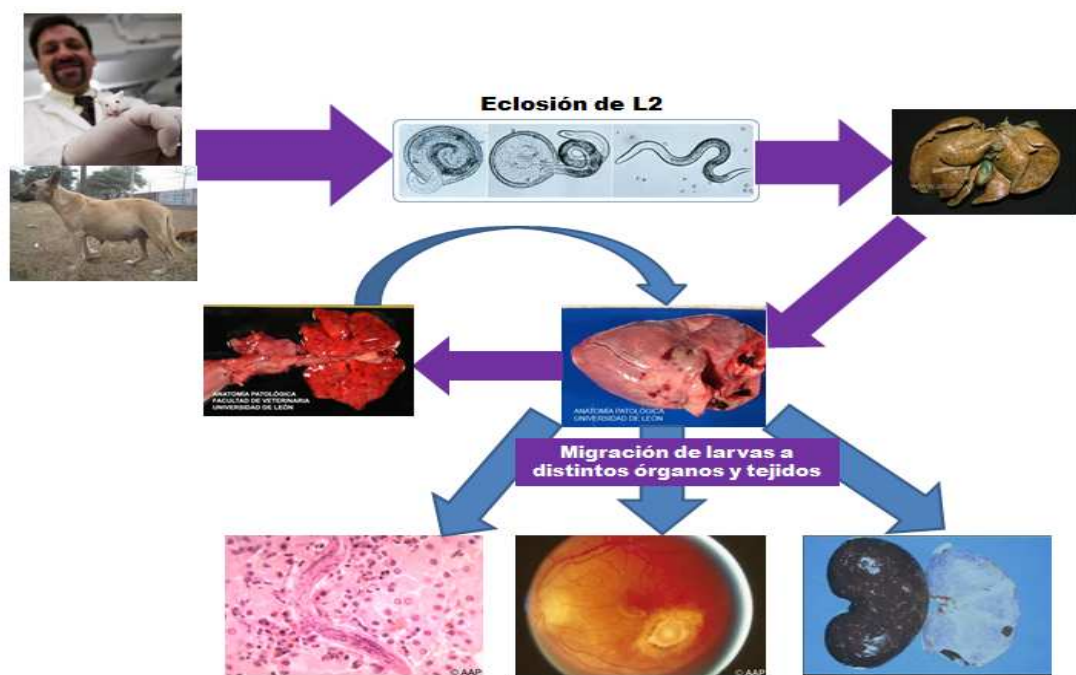


Figura 6. Ciclo biológico en perros adultos y hospederos paraténicos.

2. Toxocariosis

La toxocariosis es una infección zoonótica cosmopolita producida por *T. canis* y en menor grado por *Toxocara cati*. En los cachorros esta enfermedad puede ocasionar manifestaciones clínicas digestivas o nerviosas y ocasionalmente la muerte. La enfermedad en el hombre se produce por la ingesta accidental de huevos larvados acumulados en el agua y alimentos contaminados. Es más común en niños que juegan en áreas verdes altamente contaminadas y que por deficiencias minerales tienen hábitos como la geofagia (Holland, *et al.*, 1991; Overgaauw, 1997). Para una mejor comprensión de la enfermedad, ésta se clasifica en base a las formas clínicas que presenta. Estas fases son: *Larva Migrans Visceral (LMV)* (Beaver, *et al.*, 1952), *Larva Migrans Ocular (LMO)* (Wilder, 1950), Toxocariosis Neurológica (TN) (Glickman, *et al.*, 1981), Toxocariosis Encubierta (TE) y Toxocariosis Asintomática (TA).

2.1 Patogenia y lesiones en perros

La presencia de los parásitos adultos en el lumen intestinal, produce irritación, con una consecuente disminución en la absorción de nutrientes. Lo anterior, aunado al hecho de que los adultos se alimentan del contenido intestinal, puede generar diferentes grados de desnutrición, presencia de diarrea, vómito y en casos severos, obstrucción intestinal que conlleva a la muerte del cachorro (Quiroz, 2003).

La migración de las larvas (tanto en perros como en hospederos paraténicos), ejerce una acción traumática, y las lesiones van a depender del número de larvas y del órgano afectado. En los cachorros con infección prenatal, y lactogénica, las lesiones producidas por el paso de las larvas por el hígado y los pulmones, puede provocarles la muerte (Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2011).

Los productos de secreción-excreción de las larvas, tienen un efecto enzimático sobre los tejidos para facilitar su migración, además de generar

granulomas con infiltrado eosinofílico, que pueden generar una reacción anafiláctica (Bardón, 1992).

2.2 Signos clínicos en perros

Los animales con infecciones leves, no presentan manifestaciones clínicas aparentes. En infecciones severas, los cachorros son los que principalmente muestran signos clínicos, debido a la migración de las larvas por los distintos órganos y tejidos. A su paso por los pulmones, pueden generar signos respiratorios como tos, taquipnea y flujo nasal. También se pueden observar signos nerviosos, como incoordinación y convulsiones, ambos generados por el paso de las larvas por el sistema nervioso central. Los gusanos adultos en el intestino, producen pérdida de peso, distensión abdominal, diarrea, vómito (que puede contener parásitos) y en cuadros masivos puede haber peritonitis causada por la ruptura del intestino (Cordero *et al.*, 1999).

2.3 Cuadro clínico en humanos

2.3.1 Larva Migrans Visceral (LMV)

Este síndrome fue descrito por primera vez en la década de los 50's. Es ocasionado por la migración de las larvas a través de los distintos órganos y tejidos. Se caracteriza por presentar eosinofilia crónica (50-90%), hepatomegalia e hipergamaglobulinemia, además de otros signos como dolor abdominal, fiebre y tos crónica. La gravedad de la enfermedad, va a variar dependiendo del número de huevos larvados ingeridos así como de la localización de las larvas (Beaver, *et al.*, 1952). Los principales órganos afectados, son el hígado, el pulmón y los riñones, pudiendo presentar lesiones inflamatorias de tipo agudo o crónico. En las lesiones agudas, podemos encontrar neutrófilos y una pequeña cantidad de eosinofilos. Por otra parte, en los procesos crónicos, la lesión característica es el granuloma eosinofílico, con infiltración de células mononucleares y fibroblastos (Pearson, *et al.*, 1986).

2.3.2 Larva Migrans Ocular (LMO)

Este síndrome fue descrito por Wilder (1950), cuando al hacer la revisión de ojos enucleados por sospecha de retinoblastoma, encontró presencia de larvas de *T. canis*. Es también conocido como Toxocariosis ocular y es causado por las migraciones esporádicas de una o varias larvas del parásito al ojo del paciente. Las lesiones son de tipo granulomatoso, principalmente en la retina, y se asocian con corioretinitis, panuveitis, deformación o desprendimiento de la retina y pérdida de la visión (Glickman *et al.*, 1987). La LMO por lo general se observa en ausencia de otros signos y síntomas de LMV. Las manifestaciones clínicas que pueden estar presentes son: estrabismo, falta de agudeza visual, leucorrea, irritación ocular y endoftalmitis (Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2011).

2.3.3 Toxocariosis Neurológica (TN)

La frecuencia con la que se presenta la TN es desconocida, y afecta a hospederos de cualquier género y edad. Estas afecciones en el sistema nervioso central (SNC), son raras, y, el sitio de invasión, va a depender de varios factores, como son: el número de huevos larvados o larvas ingeridas, el fondo genético del hospedero y la existencia de una exposición previa con el parásito (Xinou *et al.*, 2003). Entre las manifestaciones neurológicas podemos encontrar meningoencefalitis eosinofílica (Moreira-Silva *et al.*, 2004) y mielitis eosinofílica (Goffette *et al.*, 2000) entre otros. Los síntomas dependerán de la cantidad de larvas que lleguen al cerebro, su localización, la gravedad de las lesiones y los procesos inflamatorios (Xinou *et al.*, 2003). En los humanos, se puede llegar a presentar dolor de cabeza, sensibilidad a la luz, confusión, debilidad, cansancio y trastornos visuales. En ratones, se han reportado cambios en el comportamiento y aprendizaje en relación al número de larvas acumuladas en el cerebro (Hamilton *et al.*, 2006).

2.3.4 Toxocariosis Encubierta (TE)

Se caracteriza por signos y síntomas no específicos, que además no están incluidos dentro de los anteriores cuadros clínicos (*LMV*, *LMO* y *TN*). Este tipo de afectación permanece sin diagnosticar generalmente, y los órganos afectados son aquellos por los cuales las larvas realizan su migración. En el caso de daño a los pulmones, puede haber compromiso del sistema respiratorio con manifestaciones como bronquitis, pulmonitis y asma. Cabe señalar que no se ha encontrado una relación significativa entre la infección con *T. canis* y el padecimiento de asma (Kincekova *et al.*, 1999), no obstante, el asma puede ser un síntoma incluido en la patogenia de la toxocariosis (Buijs *et al.*, 1995). Los pacientes con asma y con presencia de anticuerpos IgG e IgE específicos contra *Toxocara*, son considerados como casos de toxocariosis (Buijs *et al.* 1997). Otras de las manifestaciones de la TE pueden ser afecciones dérmicas (urticaria y prurigo) (Humbert *et al.*, 2000), articulares (artritis eosinofílica y linfocítica) (Reyes *et al.*, 2001), síndrome del intestino irritado y vasculitis sistémica (Hamidou *et al.*, 2002).

2.3.5 Toxocariosis Asintomática (TA)

Generalmente, la infección por *T. canis* cursa de forma asintomática y es diagnosticada por medio de serología positiva, sin que haya la necesidad de dar algún tratamiento. En algunos casos, puede haber una ligera eosinofilia que no constituye peligro alguno para el paciente, sin embargo, es importante tener en cuenta esta condición, sobre todo para los estudios epidemiológicos de esta zoonosis que cada vez resulta ser más frecuente en nuestro país (Bass *et al.*, 1983; Huapaya *et al.*, 2009).

2.4 Diagnóstico

2.4.1 Diagnóstico en hospederos definitivos

Para el diagnóstico, se debe tomar en cuenta la edad de los cánidos, ya que los cachorros son los más afectados. La presencia de signos clínicos

suggerentes de daño pulmonar, el grado de dilatación abdominal, la presencia de signos nerviosos y en algunas ocasiones la presencia de gusanos adultos en el vómito, o las heces, nos sirven como métodos de diagnóstico (Figura 7).



Figura 7. Presencia de parásitos adultos de *T. canis* en las heces de un cachorro infectado naturalmente.

Técnicas coproparasitoscópicas como Faust o McMaster, se utilizan para la detección de huevos en las heces. Ambas son técnicas fáciles de realizar, y de bajo costo. Sin embargo, esto solo se puede realizar cuando existe presencia de gusanos adultos en el intestino, y la ausencia de los huevos en las heces no excluye la presencia de larvas somáticas (Overgaauw, 1997; Alba, 2011). Para diagnosticar la presencia de larvas somáticas, se utilizan técnicas inmunológicas como el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) y Western Blot (Muñoz-Guzmán y Alba-Hurtado, 2010).

2.4.2 Diagnóstico en el suelo

Para determinar la presencia de huevos de *T. canis* en el suelo se emplean técnicas que se basan en la filtración, y en una combinación de procesos de sedimentación y flotación en soluciones sobresaturadas. La recuperación de huevos del suelo, va a depender de factores ambientales (humedad, temperatura), de la textura del suelo, del sitio de muestreo, y de la técnica de diagnóstico empleada, entre otras (Oge *et al.*, 2000). También, se han utilizado técnicas moleculares como el PCR para el diagnóstico de estadios o fracciones de ADN contenidos en el suelo (Kramer *et al.*, 2002). El conocimiento del grado de infestación del suelo, nos da una idea del riesgo potencial para la transmisión de la toxocariosis en una población establecida.

2.4.3 Diagnóstico en hospederos paraténicos

El diagnóstico en hospederos paraténicos, se puede realizar por medio de distintas técnicas como pueden ser:

- a) Histopatología: Por medio de tinciones con Hematoxilina – Eosina (H-E), se puede observar la presencia de los parásitos adultos, en aquellos órganos y tejidos por los cuales realiza su migración (Kolbeková *et al.*, 2011). Otra opción, consiste en la detección de los antígenos de excreción-secreción de *T. canis* (AgESTc) por inmunohistoquímica, en los casos en los que no existen larvas identificables en los tejidos.
- b) Serología: La prueba de elección para realizar el diagnóstico serológico es el ELISA, con el cual se ha reportado una sensibilidad del 78% y una especificidad del 93%. Adicionalmente, se han utilizado otras pruebas como el Western Blot (Magnaval *et al.*, 2002) y el ensayo de unión múltiple de antígenos (MABA) (Noya *et al.*, 1998) incluyendo AgESTc. Recientemente, se investigan nuevas técnicas inmunodiagnósticas que incluyen la clonación de antígenos recombinantes para uso serológico, particularmente ELISA y Western Blot con el fin de mejorar su sensibilidad y especificidad (Norhaida *et al.*, 2008).

2.5 Epidemiología

T. canis es uno de los parásitos más frecuentemente encontrado en los perros domésticos, principalmente en los cachorros. Debido a la alta convivencia que se ha generado entre el perro y el ser humano, la toxocariosis es una de las zoonosis helmínticas con mayor difusión a nivel mundial (Despommier, 2003). La prevalencia en los hospederos definitivos es alta, esto debido a la transmisión prenatal con la cual la mayoría de los cachorros nacen infestados. Distintos estudios a lo largo de todo el mundo arrojan frecuencias muy variables que van desde un 2.9% hasta un 86.6% (Cuadro 2).

Cuadro 2. Prevalencia de parásitos adultos de *T. canis* en distintas partes del mundo.

Año	Lugar	No. Casos	Metodo diagnóstico	Prevalencia (%)	Autor
1975	Canadá	239	Coproparasitoscópico	43.5	Seah <i>et al.</i> , 1975
1975	Accra, Ghana	100	Necropsia	40	Anteson y Corkish, 1975
1976	Canadá	332	Coproparasitoscópico	34	Ghadirian <i>et al.</i> , 1976
1976	Brasil	158	Coproparasitoscópico	44.3	Chieffi y Müller, 1976
1977	Egipto	ND	Coproparasitoscópico	80.6	Khalil, 1977
1977	Londres, Inglaterra	1000	Coproparasitoscópico	7.2	Turner y Pegg, 1977
1978	Iowa, EUA	33594	Coproparasitoscópico	3	Lightner <i>et al.</i> , 1978
1978	LA, EUA	158	Coproparasitoscópico	49.5	Marron y Schroeder, 1978
1979	Pretoria, Sudafrica	253	Necropsia	32	Verster, 1979
1980	Bangkok, Thailandia	107	Coproparasitoscópico	6.5	Hinz, 1980
1980	Nueva Zelanda	147	Coproparasitoscópico	2.8	Dodge, 1980
1981	Nigeria	ND	Coproparasitoscópico	18.55	Fashuyi, 1981
1982	Japón	15	Coproparasitoscópico	86.6	Matsumura y Endo, 1982
1982	Praga, Checoslovaquia	500	Coproparasitoscópico	3.2	Valkounová, 1982
1984	Sabah, Malasia	175	Coproparasitoscópico	81	MacAdam <i>et al.</i> , 1984
1984	Freetown, Sierra Leona	2938	Coproparasitoscópico	9	Hassan, 1984
1985	Hessia Neckar, Alemania	155	Coproparasitoscópico	5.8	Hinz y Blatz, 1985
1985	Calabar, Nigeria	254	Coproparasitoscópico	26.7	Uguchukwu y Ejimadu, 1985
1986	Bagdad, Irak	20	Necropsia	40	Tarish <i>et al.</i> , 1986
1988	La Plata, Argentina	2895	Coproparasitoscópico	14.2	Venturini y Radman, 1988
1988	Curazao	133	Coproparasitoscópico	7.5	Saleh <i>et al.</i> , 1988
1988	Grecia	232	Coproparasitoscópico	22.4	Haralabidis <i>et al.</i> , 1988
1991	Bélgica	212	Necropsia	38.9	Vanparijs <i>et al.</i> , 1991
1993	Nairobi, Kenia	156	Necropsia	3	Wachira <i>et al.</i> , 1993
1993	Oklahoma St. USA	21583	Coproparasitoscópico	4	Jordan <i>et al.</i> , 1993
1993	Hannover, Alemania	3329	Coproparasitoscópico	6.9	Epe <i>et al.</i> , 1993
1993	Melboun, Australia	493	Coproparasitoscópico	17.4	Johnston y Gasser, 1993
1994	Dublin, Irlanda	350	Coproparasitoscópico	82.6	O'Lorcain, 1994
1997	Ibaraki, Japón	916	Necropsia	79.9	Saeki <i>et al.</i> , 1997
1997	Holanda	272	Coproparasitoscópico	2.9	Overgaauw, 1997 (b)
2002	St Paulo, Brasil	271	Coproparasitoscópico	5.5	Oliveira-Sequeira <i>et al.</i> , 2002
2003	Italia	295	Coproparasitoscópico	33.6	Habluetzel <i>et al.</i> , 2003
2004	Venezuela	614	Coproparasitoscópico	11.4	Ramírez-Barrios <i>et al.</i> , 2004
2006	Finlandia	541	Coproparasitoscópico	3.1	Pullola <i>et al.</i> , 2006
2006	China	178	Necropsia	36.5	Wang <i>et al.</i> , 2006
2007	Córdoba, España	1800	Coproparasitoscópico	17.72	Martínez-Moreno <i>et al.</i> , 2007
2007	Etiopía	100	Coproparasitoscópico	21	Yacob <i>et al.</i> , 2007
2009	Nigeria	269	Coproparasitoscópico	33.8	Sowemimo, 2009
2010	Islas Galápagos	97	Coproparasitoscópico	16.5	Gingrich <i>et al.</i> , 2010
2010	Polonia	763	Coproparasitoscópico	20.6	Tylkowska <i>et al.</i> , 2010
2010	Sudáfrica	240	Coproparasitoscópico	7.9	Mukaratirwa y Singh, 2010
2011	Tirana, Albania	111	Necropsia	75.7	Xhiaxhiu <i>et al.</i> , 2011
2011	Zambia	452	Coproparasitoscópico	11.3	Bwalya <i>et al.</i> , 2011
2011	Palestina	132	Coproparasitoscópico	36.4	Othman, 2011
2012	Kerman, Iran	70	Coproparasitoscópico	4.3	Mirzaei y Foolandi, 2012
2012	Alemania	445	Coproparasitoscópico	4	Becker <i>et al.</i> , 2012

Esta variación es debida al lugar de procedencia de los animales, la edad de los mismos, las condiciones sanitarias y los métodos de diagnóstico empleados. En el caso de la República Mexicana se muestra la misma variación en estudios realizados en distintos estados (Cuadro 3).

Cuadro 3. Prevalencia de parásitos adultos de *T. canis* en distintas partes de México.

Año	Lugar	No. Casos	Metodo diagnóstico	Prevalencia (%)	Autor
1955	México D.F.	100	Necropsia	30	Flores, 1955
1967	México D.F.	120	Coproparasitoscópico	93	Quiroz, 1982
1970	Veracruz, Ver.	300	Coproparasitoscópico	9.6	Franyutti, 1970
1971	Córdova, Ver.	200	Coproparasitoscópico	13.5	Sosa, 1971
1972	Monterrey, N.L.	100	Necropsia	5	Garza, 1972
1973	Guadalajara, Jal.	450	Coproparasitoscópico	16.2	Mora, 1973
1973	Cd Victoria, Tmps	50	Coproparasitoscópico	30	Hinojosa, 1973
1973	México D.F.	979	Coproparasitoscópico	28	Mejía, 1973
1974	Cuernavaca, Mor.	719	Coproparasitoscópico	15	Vargas, 1974
1983	Aguascalientes	294	Coproparasitoscópico	47.6	Valdivia <i>et al.</i> , 1983
1986	México D.F.	200	Coproparasitoscópico	21	Cruz y col, 1986
1987	México D.F.	176	Necropsia	58.6	Cruz y col, 1987
1989	Veracruz, Ver.	447	Coproparasitoscópico	74	Zarameño y col., 1989
1992	México D.F.	240	Coproparasitoscópico	3.6	Penagos y col., 1992
1996	Culiacan, Sin.	100	Coproparasitoscópico	7	Gaxiola y col., 1996
1998	México D.F.	100	Necropsia	15	Martínez y col., 1998
1998	México D.F.	470	Coproparasitoscópico	19.8	Eguia-Aguilar, 1998
2005	México D.F.	120	Necropsia	13.3	Eguia-Aguilar, 2005
2011	Querétaro	378	Necropsia	15.1	Canto <i>et al.</i> , 2011
2011	Yucatán, Méx.	130	Coproparasitoscópico	6.2	Rodriguez-Vivas <i>et al.</i> , 2011

El efecto de la lluvia que puede arrastrar los huevos grandes distancias contaminando alimentos y agua, es un factor determinante para la diseminación de la enfermedad, sobre todo en hospederos paraténicos. En diferentes estudios, se ha mostrado presencia de huevos en áreas verdes (Holland *et al.*, 1991; Martínez-Barbosa *et al.*, 1998). Esto, en conjunto con el hábito de algunos niños a la geofagia, los vuelve la población más susceptible a padecer la enfermedad. Alrededor del 40% de la población con complicaciones oculares relacionadas con este parásito, revelaron una historia clínica de geofagia (Overgaauw, 1997). Otro riesgo potencial no se encuentra solo en las heces y en la tierra contaminada, sino también en los huevos que se adhieren al pelo de los perros (Roddie *et al.*, 2008).

Esta fuente de infección no debe ser subestimada, ya que muchos animales comparten casa y cama con sus dueños.

La alta incidencia de personas con anticuerpos anti-*Toxocara*, en diferentes partes del mundo varía entre 2.6 a 81.5 % lo que indica el alto grado de infestación por esta parasitosis. Sin embargo, la mayoría de las personas no muestran manifestaciones clínicas y estas sólo aparecen cuando son ingeridas grandes cantidades de huevos, o cuando las larvas se encuentran en lugares críticos, como son el cerebro (TN) o los ojos (LMO) (Smith, 2006).

3. Antígenos de Excreción y Secreción de *T. canis* (AgESTc)

Hay similitud entre las proteínas que forman el cuerpo de *T. canis* con las proteínas del hospedero por lo que no son reconocidas como extrañas. Sin embargo, hay otras moléculas que son reconocidas como extrañas y que son capaces de provocar una respuesta inmune. Este parásito tiene dos tipos de antígenos: los antígenos somáticos y los AgESTc.

Los antígenos somáticos, son aquellas moléculas que forman parte del cuerpo del parásito. Estos antígenos, carecen de importancia diagnóstica, ya que han demostrado tener reacciones cruzadas con los antígenos de otros helmintos (Smith *et al.*, 1982; Peixoto *et al.*, 2011). Por otra parte, los AgESTc son moléculas producidas y eliminadas por el parásito. Los más estudiados, son los producidos por las L2. Su naturaleza química, revela que son complejos de glicoproteínas. Entre los carbohidratos más frecuentemente unidos, se encuentran la N-acetilgalactosamina y la galactosa, mientras que otras tales como el arabinol, la manosa, la N - acetilglucosamina, la glucosa y la fucosa no son tan frecuentes (Meghji *et al.*, 1986). Estos hidratos de carbono, están presentes en diferentes proporciones o en la totalidad de los AgESTc, y se encuentran formando epítopes que están vinculados con el complejo de la proteína del antígeno, ya sea de una manera fuerte o débil. Algunos de estos antígenos permanecen adheridos a la cutícula de la larva para después ser liberados, lo cual es visto como un

mecanismo de evasión de la respuesta inmunológica (Maizels *et al.*, 1984). Además, se ha establecido que la respuesta inmune se dirige principalmente hacia los complejos glicosilados de estos antígenos (Maizels *et al.*, 1987).

4. Respuesta inmunológica a *T. canis*

Durante la migración de las larvas dentro del hospedero se induce una respuesta de tipo adaptativo con aumento de linfocitos T (LT) cooperadores (LTh) y T citotóxicos (LTc). Por otra parte los AgESTc estimulan a los macrófagos a producir interleucinas (IL). La IL-4, promueve una respuesta de tipo Th2 con aumento de citocinas como la IL-5, IL-6 e IL-13 (Finkelman *et al.*, 2004; Valli *et al.*, 2010; Allen *et al.*, 2011). El aumento de la IL-4 a su vez, estimula la proliferación y la maduración de los linfocitos B (LB), la variación de isotipo de IgM a IgE y la producción de anticuerpos IgG específicos (Sher, 1995), además de contribuir a la estimulación de las células cebadas (Cc) que, cuando degranulan, aumentan la respuesta inflamatoria (Figura 8).

Los AgESTc también inducen un aumento en las concentraciones de la IL-5, que es una poderosa inductora de eosinofilia, la cual es característica de esta infección (Yamaguchi *et al.*, 1998). Además de estimular una respuesta Th2, en modelos murinos, se ha observado un aumento en los niveles plasmáticos de IFN- γ , que es característico de una respuesta inmune tipo Th1 (Pecinali *et al.*, 2005). El IFN- γ , actúa sobre linfocitos T, linfocitos B, células NK y macrófagos, siendo el mediador clave de la inmunidad mediada por células. Se ha descrito una asociación entre el IFN- γ y la IL-13, sobre todo en la formación de granulomas eosinofílicos, y en otras patologías como enfermedades producidas por patógenos (esquistosomiasis) o enfermedades autoinmunes (asma, colitis ulcerativa). Estos granulomas, también se presentan por la presencia crónica de larvas de *T. canis* en los distintos órganos y tejidos por los cuales realizan su migración (Meeusen y Balic, 2000; Nagy *et al.*, 2012).

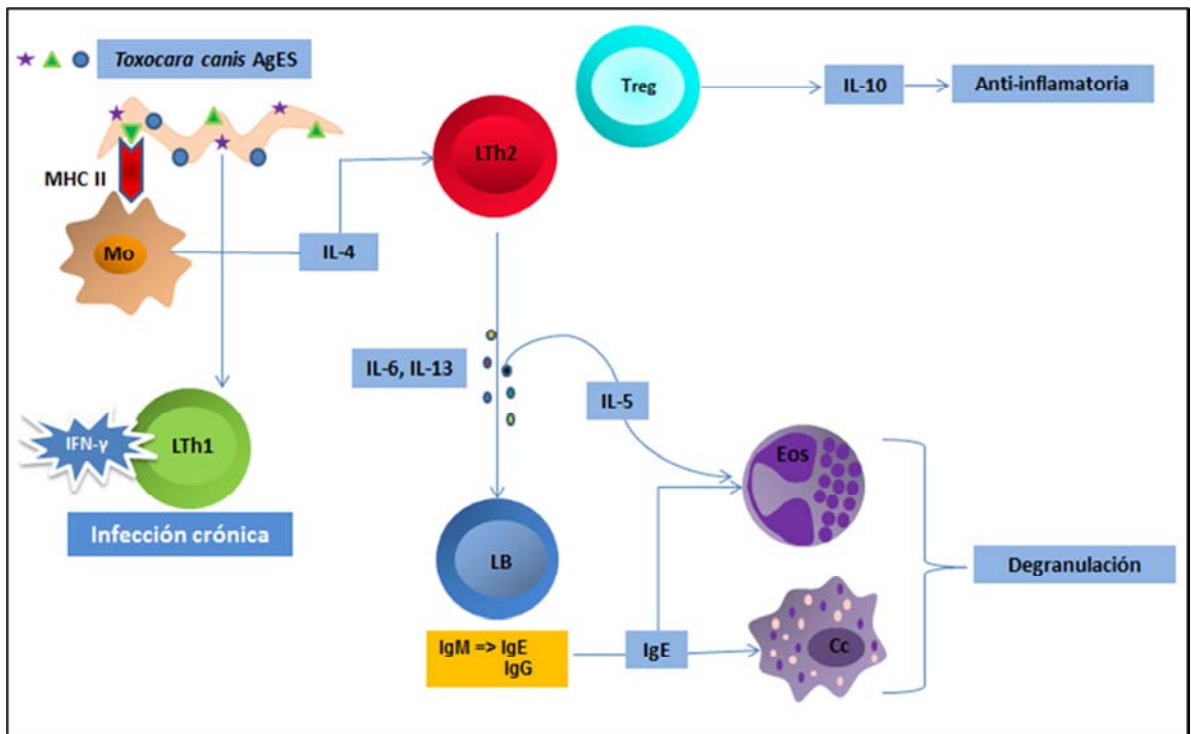


Figura 8. Respuesta inmune a L2 de *Toxocara canis*. Los antígenos del parásito estimulan la producción de citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13) por parte de los linfocitos T cooperadores (LTh2).

En modelos de infección con *T. canis*, al mismo tiempo que los procesos pro-inflamatorios se activan, las células T reguladoras (Treg) también se activan y comienzan a producir IL-10 (Torina *et al.*, 2005). Esta citocina, se caracteriza por ser inmunosupresora y anti-inflamatoria, e inhibe la respuesta granulomatosa a las larvas del parásito. La IL-10, regula la inflamación y la fibrosis actuando directamente sobre los fibroblastos reduciendo la producción de colágeno (Arai *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2001). Este efecto regulador, es aparentemente responsable del control de la respuesta inmune exagerada en el hospedero cuando las larvas de *T. canis* migran a través del organismo. Del mismo modo, se ha demostrado que el elevado número de eosinófilos pueden causar la activación de células Treg induciendo con ello la producción de IL-10 (Nagy *et al.*, 2012).

A nivel intestinal en los hospederos definitivos, la presencia y el daño producido por el parásito en el epitelio intestinal inducen la producción de alarminas (IL-25, IL-33) por parte de estas células. Estas alarminas, a su vez,

estimulan a los linfocitos T a producir IL-4, IL-9 e IL-13, que polarizan la respuesta inmune hacia Th2. La IL-13, ejerce su efecto sobre las células caliciformes, y estas comienzan a producir una gran cantidad de moco, que contribuye a la eliminación del parásito (Allen *et al.*, 2011). Por otra parte, las células Treg aumentan a nivel de la pared intestinal de los perros cuando se producen infecciones intestinales por nematodos (Junginger *et al.*, 2012) lo que sugiere que la tolerancia de la mucosa intestinal esta involucrada en la persistencia de la infección.

4.1 Respuesta inmune humoral

En la toxocariosis canina, los títulos de anticuerpos específicos IgG e IgM, se mantienen al cabo de varios meses después del contacto con el parásito. Estos títulos de anticuerpos, no se correlacionan con la cantidad de parásitos adultos en el intestino, pero sí están relacionados con la cantidad de antígenos circulantes (Matsumura, 1983). En hospederos paraténicos, la producción de anticuerpos en un principio es similar a la observada en los hospederos definitivos, pero, los anticuerpos isotipo IgM, disminuyen durante los primeros 10 días post-infección, mientras que los anticuerpos IgG, aumentan progresivamente hasta los 30 días post-infección, y estos niveles permanecen constantes durante varios meses más. Estudios clínicos, muestran que los pacientes con *LMV* o *LMO* tienen cantidades mayores de anticuerpos de la subclase IgG1 específicos contra *T. canis*. También se ha observado que la cantidad total de anticuerpos IgE se encuentra incrementada (Kayes, 2006).

4.2 Eosinofilia

La eosinofilia generalizada, es uno de los signos más representativos de la infección con *T. canis*. Las características de esta eosinofilia, varían dependiendo el tipo de hospedero: en los ratones y los jerbos, se producen picos durante los primeros 40 días post-infección (Sugane y Oshima, 1982; Alba-Hurtado *et al.*, 2009) mientras que en los seres humanos, hay una eosinofilia persistente hasta por un año (Beaver, 1952; Limaye *et al.*, 1990). En el caso de los hospederos

definitivos, la eosinofilia aparece a los 7 días post-infección y desaparece a los 42 (Zimmermann *et al.*, 1985). En las crías con infección transplacentaria, se observa un pico de eosinófilos 7 días después del nacimiento, y disminuye lentamente, hasta que llega a niveles fisiológicos 42 días después del nacimiento (Vossmann y Stoye, 1986).

La eosinofilia puede ser inducida por pequeñas cantidades de larvas, y es dependiente de la IL-5. En modelos experimentales de la infección, se ha demostrado que la administración de anticuerpos anti-IL-5, suprime el aumento de eosinófilos en sangre (Coffman *et al.*, 1989; Limaye *et al.*, 1990). También, se ha demostrado que los linfocitos Th2, son los principales productores de IL-5, ya que cuando se aplican anticuerpos anti-CD4 en modelos murinos, el segundo pico de eosinófilos timodependiente se reduce. En general, el papel de los eosinófilos en la defensa contra infecciones causadas por helmintos ha generado controversia. Por una parte, experimentos *in vitro* indican que los eosinófilos pueden tener un efecto tóxico en ciertos parásitos, y la eosinofilia se ha asociado a la eliminación de otros nematodos como en el caso de *Haemonchus contortus* (Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2013). Sin embargo, en las infecciones por *T. canis*, los eosinófilos aumentan a lo largo de la infección, y rodean a las larvas en los tejidos, pero, aparentemente, no producen daños graves a las mismas. En otro experimento *in vitro*, se reportó que la incubación de larvas de *T. canis* con eosinófilos y suero hiperinmune, causa la fijación y degranulación de los eosinófilos en la cutícula de las larvas, pero, esto no afecta la motilidad o viabilidad de las mismas (Fattah *et al.*, 1986).

4.3 Consecuencias de la activación hiperinmune durante la infección: *T. canis* y asma

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica del tracto respiratorio inferior que se caracteriza por un aumento en los niveles de IgE inducidos por la inflamación eosinofílica, la hipersecreción de moco y la hiperreactividad bronquial

después de someterse a la exposición a alérgenos. Esta enfermedad es el resultado de una respuesta de tipo Th2 a alérgenos aéreos (Weiss, 2000). Durante la enfermedad, hay un aumento de IL-4, IL-5 e IL-13, que van a mediar la síntesis de IgE, la degranulación de eosinófilos y la hiperreactividad de las vías respiratorias (Holt *et al.*, 1999).

Existen estudios que relacionan la seroprevalencia a *Toxocara*, con manifestaciones alérgicas como el asma. Sin embargo, también hay estudios en los cuales no se encontró dicha relación. Estas diferencias, principalmente, pueden deberse a la forma en la cual se llevaron a cabo los estudios (Buijs *et al.*, 1994; Chan *et al.*, 2001; Sharghi *et al.*, 2001; Muñoz *et al.*, 2010). Entre estas diferencias, encontramos aspectos como el tipo de prueba serológica utilizada, la diferencia de criterios para determinar la seropositividad, la edad y el sexo de la población en estudio. En general, se acepta que la infección con larvas de *Toxocara* está relacionada con la aparición de asma (Cooper, 2008), aunque, algunos investigadores han sugerido que las infecciones parasitarias por helmintos reducen el riesgo de padecer alergias debido a sus propiedades inmunosupresoras (Maizels, 2005). Sin embargo, la adaptación de los parásitos a sus hospederos debe ser tomada en cuenta en el caso específico de *T. canis*, ya que se adapta mejor a los hospederos definitivos, que a los paraténicos, los cuales responden con mayor fuerza contra el parásito, por lo tanto, producen un efecto patogénico más grave (Maizels, 2013).

En modelos experimentales, las larvas de *T. canis* que se encuentran en los pulmones, inducen una respuesta inmune de tipo Th2, en conjunto con un aumento en el número de eosinófilos, macrófagos, linfocitos e IgE. Aunque la mayoría de las larvas van a migrar de los pulmones a otros órganos, algunas permanecen atrapadas dentro de granulomas bien definidos, con lo cual, la inflamación pulmonar puede permanecer hasta por tres meses (Buijs *et al.*, 1994). Del mismo modo, algunas larvas pueden continuar su migración, y regresar a los pulmones, de tal manera que puede haber lesiones crónicas y agudas al mismo

tiempo (Figura 9). El tipo de infiltrado celular en el tejido pulmonar de ratones infectados experimentalmente con *T. canis*, es similar al observado en modelos experimentales de ratones con asma alérgica producida por la sensibilización con ovoalbúmina (Hessel *et al.*, 1995, Pinelli *et al.*, 2001).

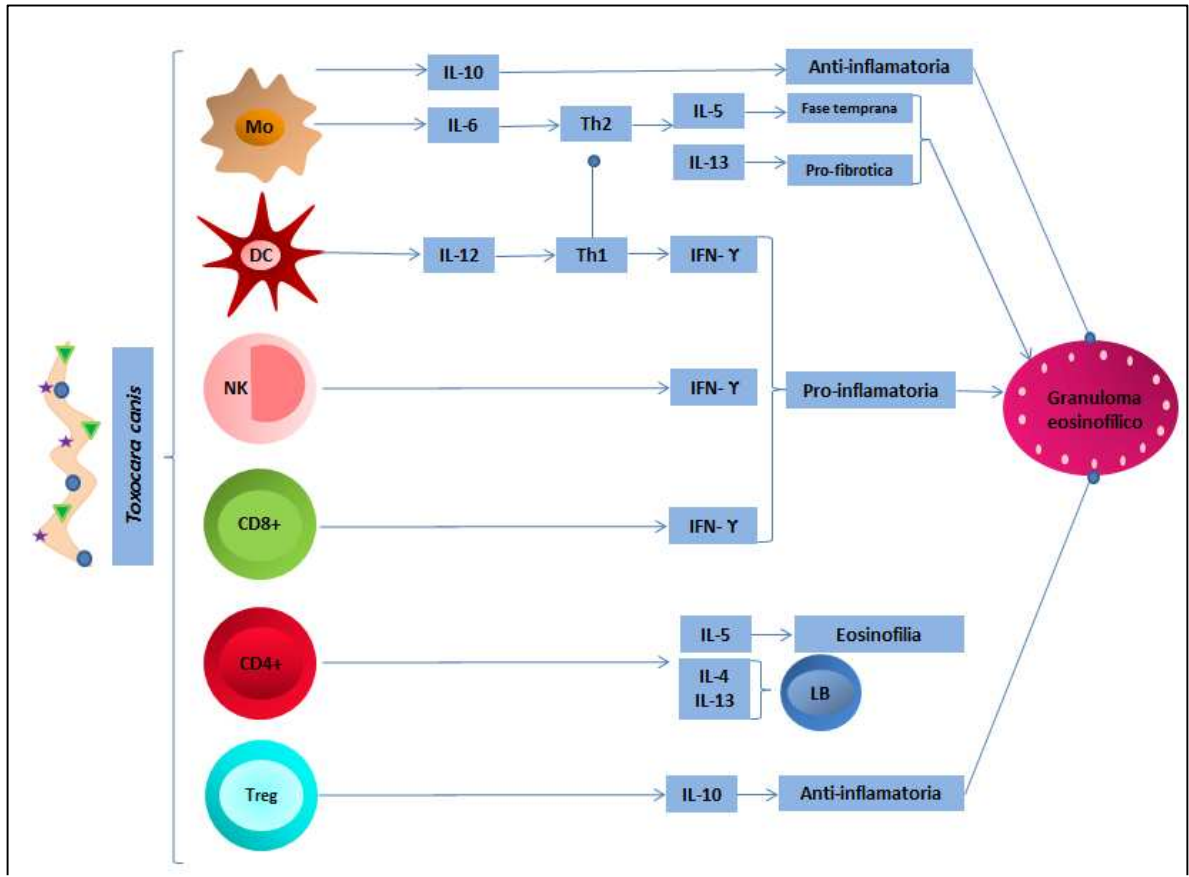


Figura 9. Esquema que muestra la respuesta por parte del hospedero a las larvas de *T. canis*, estas incluyen actividades anti-inflamatorias, pro-inflamatorias y pro-fibróticas que van encaminadas a la localización y eliminación del parásito. Macrófagos (Mo), células dendríticas (DC), células asesinas naturales (NK), linfocitos T citotóxicos (CD8+), linfocitos T cooperadores (CD4+), linfocitos B (LB).

Como se ha mencionado, la infección por *T. canis* desencadena una respuesta de tipo Th2 que se caracteriza por la producción de IL-4, IL-5, IL-13 e infiltración de eosinófilos, macrófagos y células cebadas. La presencia de larvas vivas o muertas y la circulación de antígenos de parásitos tienen una actividad mitogénica en los linfocitos, por lo tanto, este tipo de respuesta inmune permanece durante largos períodos, además la IgE específica contra el parásito se

incrementa. En individuos alérgicos, cuando el alérgeno penetra por las vías respiratorias, la IgE reacciona y se une a receptores de alta y baja afinidad de células cebadas, eosinófilos y macrófagos, que a su vez, secretan mediadores implicados en la respuesta asmática temprana (factor de activación de las plaquetas y los leucotrienos C4) y en la respuesta tardía (prostaglandina y leucotrienos C4). Basado en este modelo (Figura 10), la respuesta inmune inducida después de la infección con *T. canis*, puede desencadenar manifestaciones alérgicas en personas que son alérgicas o que tienen predisposición genética a las alergias (Cooper, 2008, Pinelli y Aranzamendi, 2012).

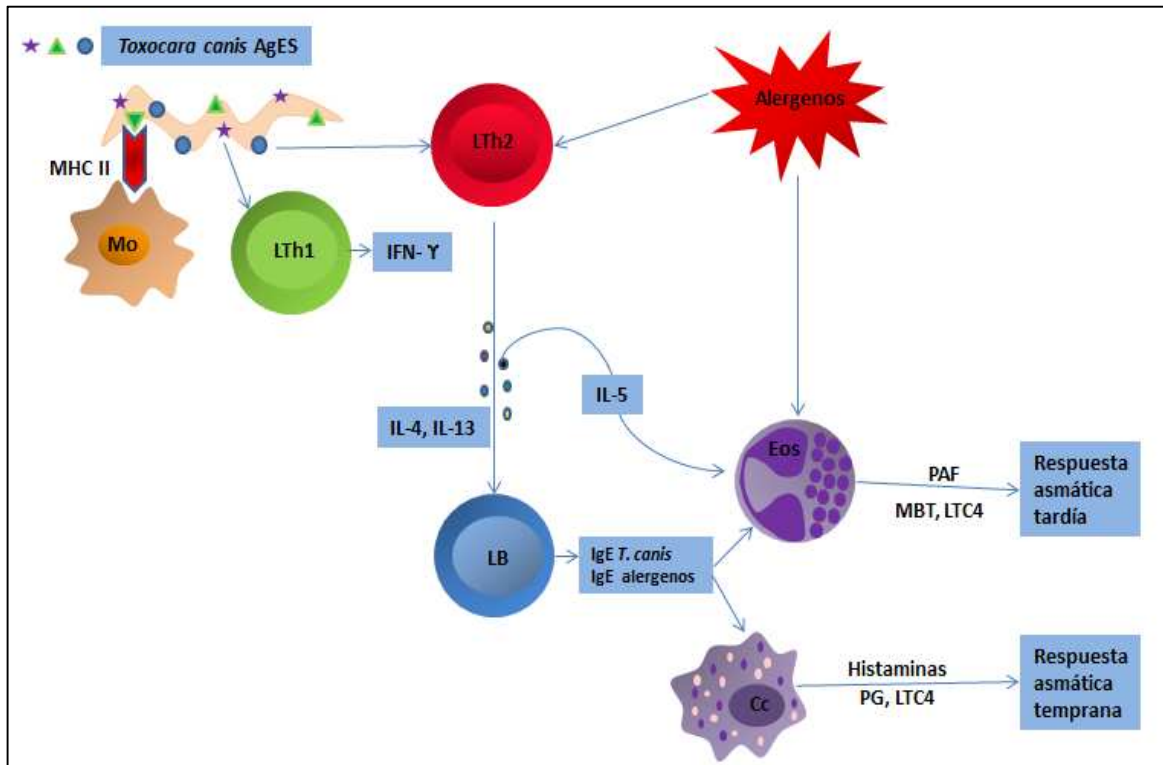


Figura 10. Mecanismo propuesto donde se resalta la asociación entre la infección por *T. canis* y el asma alérgica. Después de la exposición al alérgeno la IgE se unen a los receptores de alta y baja afinidad en las células cebadas (Cc) y eosinófilos (Eos), estos secretan varios mediadores implicados en la inducción de la respuesta asmática temprana (factor de activación de plaquetas (PAF), leucotrienos C4 (LTC4)) y en la respuesta asmática tardía (histamina, prostaglandinas (PG) y LTC4).

5. Prolactina (PRL)

La PRL es una hormona proteica formada por 199 residuos de aminoácidos (23 kDa), es sintetizada y segregada por los lactotopos de la adenohipófisis. Esta hormona ha sido identificada en todos los animales vertebrados. Se le han asociado más de 300 funciones biológicas diferentes, incluyendo el equilibrio hídrico y electrolítico, el crecimiento y desarrollo, metabolismo y regulación endocrina, comportamiento, inmunomodulación y reproducción. Aunque la mayoría de PRL circulante es de origen hipofisiario, el gen de la PRL se expresa en varios sitios extrahipofisarios en los mamíferos, incluyendo la glándula mamaria (Shaw-Bruha *et al.*, 1997; Kurtz *et al.*, 1993), la decidua uterina (Prigent-Tessier *et al.*, 1999), la próstata (Nevalainen *et al.*, 1997), las células del sistema inmune (Shah *et al.*, 1991; Kooijman *et al.*, 2000), el tejido adiposo (Zinger *et al.*, 2003), y las células endoteliales umbilicales (Corbacho *et al.*, 2000).

5.1. Receptores de PRL (RPRL)

El RPRL fue identificado por primera vez en 1974 (Posner, *et al.*) y se reportó como un receptor de membrana unido a proteínas que es específico, saturable y de alta afinidad. La secuencia del RPRL fue descrita en 1988 y está muy estrechamente relacionado con el receptor de la hormona de crecimiento (GH-R) (Boutin *et al.*, 1988). Tanto el PRL-R como el GH-R son miembros de la familia de receptores de tipo 1 de citocinas, que también incluye al receptor para la eritropoyetina y para muchas de las interleucinas (Bazan, 1989; Cosman *et al.*, 1990).

Existen varias isoformas del RPRL y se conocen como largo, corto e intermedio en función de su longitud total. Estas isoformas difieren en el tamaño (corto, intermedio y largo) y la composición de la porción intracelular. Exhiben un dominio extracelular idéntico de aproximadamente 200 aminoácidos. El dominio transmembranal posee 24 aminoácidos, mientras el intracelular presenta diferentes tamaños y composiciones, dependiendo de la isoforma del receptor. La

isoforma larga posee 598 aminoácidos de longitud; la isoforma intermedia, 325 aminoácidos y 2 isoformas pequeñas de 352 y 264 aminoácidos cada una (Tan y Walker, 2010). Se ha demostrado la expresión del receptor en células de cerebro, retina, cartílago, piel, pulmón, corazón, páncreas, hígado, bazo, timo, tracto intestinal, riñón, sistema reproductivo, linfocitos (T y B), macrófagos, etc.

5.2. Regulación de la secreción de PRL hipofisaria

La secreción de PRL se regula de manera compleja por una variedad de hormonas y neurotransmisores (Lamberts y Macleod, 1990; Freeman *et al.*, 2000), además es influenciada por el fotoperiodo, los patrones de sueño y el estrés. En los mamíferos los lactotrofos hipofisarios son secretores que no requieren de un estímulo agudo para mantener la secreción. Prueba de ello es la síntesis y liberación de grandes cantidades de PRL en tejido de adenohipófisis que ha sido retirado de control hipotalámico, como en los trasplantes de adenohipófisis a sitios ectópicos.

Esto nos indica que por lo tanto, el principal insumo regulador para los lactotrofos de mamíferos es inhibitorio. Esta inhibición de la secreción de PRL está mediada casi en su totalidad por la dopamina (DA) producida por las neuronas tuberoinfundibulares en el núcleo arqueado del hipotálamo. La DA es liberada de terminales nerviosas en la eminencia media y se dirige a la adenohipófisis a través de los vasos portales hipofisarios (Ben-Jonathan y Hnasko, 2001). La PRL a su vez, se alimenta de

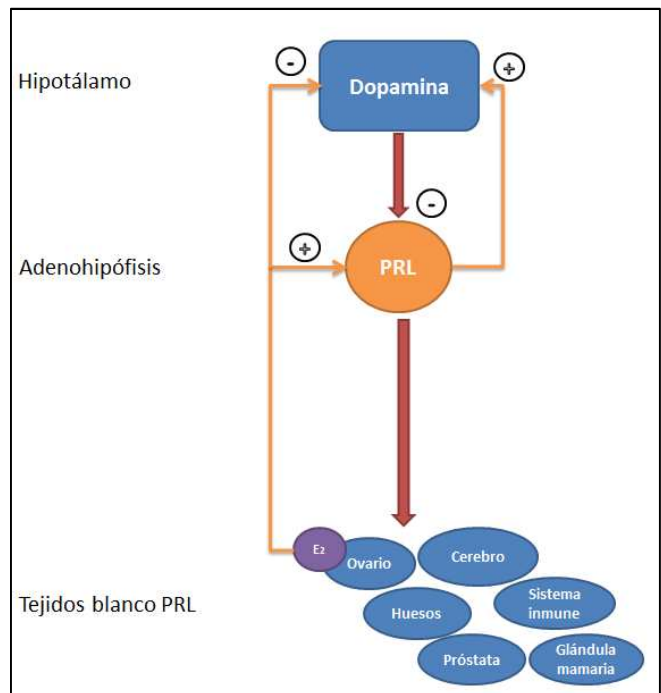


Figura 11. Ilustración esquemática de la interacción entre el hipotálamo, la adenohipófisis y los tejidos blancos de la PRL en la regulación de la secreción de PRL en mamíferos.

La PRL a su vez, se alimenta de

nuevo en las neuronas del hipotálamo para regular la liberación de DA y, en última instancia, su propia liberación (Gudelsky y Porter, 1980) (Figura 11).

5.3. PRL y sistema inmunológico

La relación entre la PRL y el sistema inmune se evidenció cuando se observó atrofia tímica en ratas que habían sido hipofisectomizadas (Smith, 1930). Posteriormente, Nagy y Berczy (1978) publicaron su trabajo acerca de la inmunodeficiencia en ratas hipofisectomizadas, donde la administración de PRL, de hormona de crecimiento y de lactógeno placentario restableció la actividad inmunológica. Experimentos similares utilizando bromocriptina (agonista dopaminérgico) para inhibir selectivamente la secreción de PRL, mostraron resultados similares al trabajo anterior. Es decir, la disminución en la respuesta inmune tanto celular como humoral, que se restablece al suspender la bromocriptina (Nagy *et al.*, 1983). Además, se ha encontrado que el sistema inmune es capaz de regular la secreción de prolactina (Matera, 1997). Las citocinas IL-1, IL-6 y TNF α pueden actuar como reguladores endócrinos en la liberación de PRL hipofisiaria (Spangelo y Macleod, 1990).

En los linfocitos, reguladores conocidos de la síntesis de la PRL hipofisiaria como los estrógenos, el péptido intestinal vasoactivo, la hormona liberadora de tirotropina y un agonista de receptores D2 de la dopamina (bromocriptina) no modifican la expresión del gen de la PRL. Por el contrario, la dexametasona y la ciclosporina inhiben la expresión de la PRL linfocitaria, y el ácido retinoico la estimula (Gellersen *et al.*, 1989).

En otros estudios, se observó que la utilización de anticuerpos anti-PRL inhibe la proliferación de células linfoides en presencia, tanto de mitógenos específicos de LT y LB, como de citocinas como la IL-2 e IL-4 que también actúan como factores de crecimiento (Hartmann *et al.*, 1989). También se observó que la adición de PRL combinada con IL-2, fitohemaglutinina o concavalina A estimula la mitosis de LT, LB y de células NK mantenidos en cultivo (Clevenger *et al.*, 1990).

Utilizando la técnica de Northern blot en una línea linfoblastoide de células B, también se demostró la presencia del RNAm de PRL y, posteriormente, mediante la técnica de RT-PCR se encontró que no solamente en líneas celulares linfoides se expresa el mensajero de PRL, sino también en células linfocitarias normales, como timocitos y células mononucleares de sangre periférica humana (Mendez *et al.*, 2005). En los granulocitos, la PRL regula la síntesis de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), enzima que produce óxido nítrico que media la respuesta inmunológica y la inflamación (Dogusan *et al.*, 2001). La PRL también estimula la síntesis de la IL-2 y su receptor en esplenocitos y timocitos, además de colaborar en las acciones de la IL-2 e IL-12 estimulando la síntesis de IFN- γ en los LT y en las células NK (Viselli *et al.*, 1991)

En la actualidad la PRL es considerada no solo como una hormona, si no también como una citocina que polariza una respuesta inmune celular, estimulando la secreción de citocinas tipo Th1 (IL-2, IL-12, IFN- γ), además de participar en la regulación de la densidad de la población celular controlando tanto la proliferación como la muerte.

6. La red neuroinmunoendócrina en las enfermedades parasitarias

La interacción entre los sistema inmune, endócrino y nervioso, forma una compleja red de comunicación directa y bidireccional que actúa de manera conjunta durante los procesos infecciosos para la eliminación adecuada de los patógenos y el mantenimiento de la homeostasis (Besedovsky y Del Rey, 1996). Anteriormente se consideraba que el sistema inmunológico se regulaba de forma autónoma, dejando de lado la trascendental comunicación multidireccional que este sistema tiene con el sistema neuroendócrino. Esta relación se puso de manifiesto en estudios realizados donde se observó que el tamaño del timo era mayor en conejos castrados y que la restitución con andrógenos exógenos revertía la hipertrofia tímica (Chiodi, 1940). También se ha observado que la tasa de producción de anticuerpos es mayor en hembras que en machos, esto debido a

la capacidad que tienen los estrógenos de estimular a los linfocitos B. Esto se ve reflejado en la predisposición que tienen las mujeres al padecimiento de enfermedades autoinmunes (esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, etc), donde, en algunas de estas enfermedades 9 de 10 casos se presentan en mujeres (De Leon y Morales-Montor, 2006).

Aunado a esto se sabe que citocinas como la IL-6, la IL-1 β y el factor inhibidor de la migración de macrófagos tienen efectos sobre neuronas hipocampales e hipofisarias (Tonelly y Postolache, 2005). Estas estructuras producen a su vez neuropéptidos como el péptido intestinal vasoactivo (VIP), la somatostatina y la sustancia P, todas ellas con importantes repercusiones en la regulación de la inflamación sistémica y a nivel de mucosas (Agro y Stanis, 1995). Por otra parte, los glucocorticoides pueden reprimir la respuesta inflamatoria por medio de una disminución en los niveles de IFN- γ y de IL-12 (Elenkov, 2004).

Estos ejemplos nos demuestran que el sistema inmunológico se regula y es regulado por el macrosistema neuroinmunoendócrino, a través del pleitropismo de los distintos mensajeros químicos que lo conforman, así como de la gama de receptores y moléculas efectoras compartidas entre los tres sistemas. Sin embargo el grado de complejidad no termina ahí: Un parásito, conformado por sus propias células, tejidos, órganos, etc representa un nivel más en el escalonamiento de complejidad de la red neuroinmunoendócrina.

6.1 Hormonas esteroideas y enfermedades parasitarias

Las hormonas esteroideas además de participar y coordinar diversas funciones como el crecimiento, la reproducción, etc, también son capaces de regular la respuesta inmunológica contra patógenos (Akmaev, 1996). Por otra parte, los parásitos han desarrollado diversos mecanismos de sobrevivencia en el hospedero para facilitar la infección. Estos mecanismos se dividen en 3 tipos: la evasión de la respuesta inmunológica a través de distintas estrategias como la

exclusión anatómica, el enmascaramiento y variación antigénica y el mimetismo molecular (Morales-Montor, 1995), la polarización de la respuesta inmune del hospedero hacia una respuesta permisiva de la infección y la explotación de algún componente del hospedero por parte del parásito (Damian, 1997).

Evidencias recientes sugieren un nuevo mecanismo de explotación del hospedero por parte del parásito, en donde éste último aprovecha directa o indirectamente hormonas y factores de crecimiento del hospedero que le permiten un rápido establecimiento y una mayor efectividad en su tasa reproductiva, ambos, procesos claves en el mantenimiento del ciclo vital del parásito (Freilich *et al.*, 2000; Morales-Montor *et al.*, 2001). De manera específica, las hormonas producidas por el hospedero pueden regular funciones vitales del parásito. Este fenómeno, aunado a la respuesta inmunológica, podría decidir el rumbo de una infección parasitaria.

Estudios realizados con *Leishmania sp.* en modelos murinos, señalan que los machos desarrollan una fuerte respuesta inmune tipo Th1, mientras que en las hembras hay una respuesta más equilibrada o con una leve inclinación hacia un perfil Th2 (Roberts *et al.*, 2001). También se ha reportado que durante la gestación se incrementa la susceptibilidad de los ratones a *Leishmania major*, esto se asocia a un aumento en los niveles de estrógenos y progesterona, con una fuerte polarización hacia una respuesta inmune Th2 (Krishnan *et al.*, 1996).

Experimentos *in vitro* con el parásito *Schistosoma mansoni* demuestran que el tratamiento con dehidroepiandrosterona (DHEA), en cercarias, esquistosomulas y gusanos adultos inhibe hasta en un 100% la viabilidad y ovoposición, mientras que el tratamiento con cortisol afecta sólo la ovoposición en el gusano adulto (Morales-Montor *et al.*, 2001). Por otro lado, amastigotes de *Trypanosoma cruzi* tratados *in vitro* con factor de crecimiento epidermal (EGF) murino, incrementan considerablemente su síntesis de ADN, crecimiento y actividad metabólica (Ghansan *et al.*, 2002).

En el caso de *Taenia crassiceps* se ha demostrado que el 17 β -estradiol está implicado en el crecimiento y reproducción del parásito, con lo cual, existe una mayor carga parasitaria en las hembras. La infección de ratones macho con este parásito disminuye las concentraciones de testosterona, aumentando las concentraciones de estradiol y con ello inhibiendo conductas sexuales como la monta, la intromisión y la respuesta eyaculatoria (Morales-Montor *et al.*, 1996).

6.2 PRL y enfermedades parasitarias

A raíz del descubrimiento de que la PRL polariza una respuesta inmune tipo Th1 se han realizado distintos experimentos en los cuales se ha visto el papel de esta hormona en el desarrollo de distintas enfermedades. Varios de estos estudios van enfocados a enfermedades parasitarias de importancia médica y veterinaria.

El efecto de la PRL durante las infecciones por protozoarios ha sido ampliamente estudiado en comparación de otros parásitos. Experimentos realizados en un modelo murino de toxoplasmosis sugieren que tanto el TNF- α como la PRL pueden estimular a las células microgliales para montar una respuesta anti-toxoplasma induciendo la destrucción intracelular de los parásitos y la liberación de citocinas como IL-1 β , IL-3 e IL-6 (Benedetto *et al.*, 2001).

Recientemente, se estudió la seroprevalencia de anticuerpos anti-*T. gondii* en mujeres con niveles normales de PRL, con hiperprolactinemia e hipoprolactinemia. Las mujeres con hiperprolactinemia mostraron una seroprevalencia más baja que aquellas con niveles de PRL normales (Dzitko *et al.*, 2008), esto sugiere que altos niveles de PRL pueden ser uno de los factores importantes para la prevención de la infección con *T. gondii* en mujeres.

En el caso de la Leishmaniasis, la posible participación de la PRL no se ha determinado totalmente. En un trabajo realizado por Gómez *et al.* en el 2003, se establece que hembras lactantes de hamster sirio que fueron infectadas con *Leishmania infantum* no desarrollaron la enfermedad, en comparación con las

hembras infectadas no lactantes. Esto nos sugiere una función protectora de la PRL durante la infección por *Leishmania*, sin embargo, aún se necesitan más estudios para determinar las funciones específicas de la PRL para inducir la protección (Gómez *et al.*, 2003).

La malaria (enfermedad ocasionada por el protozooario *Plasmodium falciparum*) es un grave problema de salud entre las mujeres gestantes en zonas endémicas, en comparación con las mujeres no gestantes. En un estudio realizado por Bayoumi *et al.* en el 2009, reportaron niveles de PRL bajos en mujeres embarazadas infectadas en comparación con mujeres embarazadas no infectadas. También encontró una correlación negativa entre la PRL y la IL-4 e IL-10, pero no encontró una correlación significativa entre la PRL y el cortisol, sugiriendo que los bajos niveles hormonales de PRL pueden incrementar la susceptibilidad a la infección (Bayoumi *et al.*, 2009).

Como ya se mencionó anteriormente, en el caso de *T. canis* se sugiere que la PRL es la hormona responsable del fenómeno de reactivación larvaria. En el estudio realizado por Overgaauw (1998), relaciona el aumento de la PRL durante la gestación de las perras, con un aumento en los títulos de anticuerpos específicos anti-*T. canis*. En otro estudio realizado en ratones donde se administró PRL, se sugiere que esta hormona es la causal de la migración larvaria hacia la glándula mamaria (Jin *et al.*, 2008). Estos son dos de los hallazgos más importantes encontrados en la literatura pero cabe mencionar que estos estudios han sido realizados en hembras, donde el ambiente hormonal no solo está formado por PRL sino también por otras hormonas como la progesterona y el estradiol.

JUSTIFICACIÓN

Aunque existen reportes del papel de la PRL en la reactivación de las larvas somáticas de *T. canis*, hasta la fecha no se ha determinado completamente el papel de esta hormona, ni los mecanismos utilizados en la regulación de la respuesta inmune ni del sistema neuroendocrino que están involucrados en el desarrollo del parásito dentro de un hospedero. En el presente estudio, se pretende evaluar el comportamiento del sistema inmune y el fenómeno de migración de las larvas somáticas de *T. canis* en condiciones normales, de hiperprolactinemia y de hipoprolactinemia en un modelo murino, con la finalidad de tener una mejor comprensión entre la respuesta generada por el hospedero y los posibles mecanismos de transregulación del parásito.

HIPÓTESIS

La prolactina es un factor que estimulará la reactivación de las larvas somáticas de *T. canis* inhibiendo la respuesta inmunológica encargada del control y la eliminación del parásito.

OBJETIVOS

1. Objetivo general

Determinar la función de la prolactina sobre la reactivación de las larvas de *T. canis* mediante la evaluación de la respuesta inmune específica contra el parásito en un modelo murino.

2. Objetivos específicos

- a) Determinar las cargas parasitarias en glándula mamaria, cerebro y pulmón por medio de digestión artificial en los grupos de ratas macho infectadas.
- b) Evaluar por citometría de flujo el porcentaje de las subpoblaciones celulares en LT (CD3+, CD4+, CD8+), LB (CD45+), células NK y LT $\gamma\delta$ obtenidos de bazo, GLM y GLP en los grupos de ratas macho infectadas y control.
- c) Analizar la expresión del receptor de PRL por citometría de flujo en LT (CD3+, CD4+, CD8+), LB (CD45+), células NK (CD161+) y LT $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta$) obtenidos de bazo, ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) y ganglios linfáticos periféricos (GLP) en los grupos de ratas macho infectadas y control.
- d) Determinar por ELISA los títulos de anticuerpos específicos anti- *T. canis* en los grupos de ratas macho infectadas y control.
- e) Observar el efecto de la hipofisectomía sobre la reactivación de las larvas de *T. canis* por análisis histológico y tinciones con H-E en pulmón, hígado y riñón.
- f) Observar el papel de la hiperprolactinemia sobre la reactivación de las larvas de *T. canis* por análisis histológico y tinciones H-E en pulmón, hígado y riñón.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Localización

El estudio se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), sede del circuito escolar de la UNAM.

2. Animales y alimentación

Se utilizaron 56 ratas Wistar machos de 2 meses de edad otorgados por el bioterio del IIB de la UNAM. El protocolo para el uso de animales de experimentación está aprobado por el comité de ética de la FMVZ (CICUAE) y del IIB (CICUAL) de la UNAM. Se formaron 10 grupos y se alojaron en cajas de policarbonato (50cm largo x 23cm de ancho y 21 cm de altura). Los grupos se dividieron de la siguiente forma:

Cuadro 4. Grupos experimentales

Ratas sin infección	Ratas infectadas
Intactas $n=5$	Intactas $n=5$
Cirugía simulada de hipofisectomía (Sham) $n=5$	Cirugía simulada de hipofisectomía (Sham) $n=5$
Hipofisectomía $n=5$	Hipofisectomía $n=5$
Cirugía simulada de implante de adenohipófisis en cápsula renal (Sham) $n=5$	Cirugía simulada de implante de adenohipófisis en cápsula renal (Sham) $n=5$
Implante de adenohipófisis en cápsula renal $n=6$	Implante de adenohipófisis en cápsula renal $n=10$

Los animales se mantuvieron en ciclos de 12 horas luz/obscuridad. Las camas proporcionadas fueron de aserrín estéril con cambios cada tercer día. Con el fin de cubrir los requerimientos de crecimiento y mantenimiento el agua y el alimento se ofrecieron *ad libitum* en condiciones estériles. El alimento posee una composición química de: proteína cruda 19%, grasa cruda 9%min, fibra cruda

5%max (Harlan 2019S Teklad Global 19% Protein Extruded Rodent Diet Sterilizable).

3. Obtención y procesamiento de los huevos de *T. canis*

Los huevos se obtuvieron a partir de parásitos adultos obtenidos del intestino delgado de cachorros de entre uno y cuatro meses infectados naturalmente y sacrificados de forma humanitaria en el Centro de Control Canino de Cuautitlán, Estado de México. Las hembras fueron separadas de los machos, se enjuagaron con agua corriente y se colocaron en buffer de fosfatos salino (PBS) 1x. Posteriormente se procedió a obtener los úteros haciendo una incisión al final del primer tercio del cuerpo. Los úteros se colocaron en solución salina fisiológica (SSF), se obtuvieron los huevos y con un colador de poro fino se eliminaron los restos del parásito. Los huevos se sometieron a varios lavados con PBS 1x centrifugando a 2500 rpm durante 5 minutos. Los huevos sedimentados se resuspendieron en solución PBS-formaldehído al 2% y se incubaron a 27°C por 28 días para la obtención de la forma infectiva (huevos larvados). Al finalizar se verificó la viabilidad mediante la observación al microscopio de larvas móviles dentro del huevo.

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

4. Infección de las ratas

Previo a realizar la infección se realizaron 3 lavados del inóculo para retirar la solución PBS-formaldehído. Al finalizar los huevos quedaron resuspendidos en SSF y se concentraron a 2000 HL por ml. La infección se llevó a cabo intragástricamente con una sonda metálica tipo Foley a los dos meses de edad inoculando 2000 HL por rata.

5. Procedimientos quirúrgicos

Los procedimientos quirúrgicos se realizaron a los 45 días post-infección (dpi) con la colaboración del Dr. Andrés Quintanar Stephano, miembro del departamento de fisiología y farmacología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Las cirugías realizadas fueron; cirugías simuladas (sham) de hipofisectomía y de trasplante de adenohipófisis en cápsula renal, hipofisectomías totales e implantes de adenohipófisis en cápsula renal.

5.1 Hipofisectomía

5.1.1 Material e instrumental

Cuadro 5. Material e instrumental para hipofisectomía

Instrumental	Material
Abatelenguas	Mesa de cirugía
Cánula traqueal con mandril	Motor de dentista de baja frecuencia
Bisturí	Broca de bola del #8 o #5
Pinza de disección fina sin dientes	Hilos para sujetar patas
Tijeras rectas finas	Hilo y aguja para suturar
Disectores de metal	Rasuradora
Lengüetas para hueso	Microscopio estereoscópico con luz
Separadores de metal	Bomba de vacío
Aspirador de sangre y moco	Jeringa de 1ml
Tijeras mayo rectas	Cámara de recuperación
Pinza de disección fina con dientes	Oxígeno clínico
Porta agujas	Colchón térmico



Figura 12. Parte del material e instrumental quirúrgico utilizado para la hipofisectomía. 1) abatelenguas, 2) cánula traqueal con mandril, 3) bisturí, 4) pinzas de disección finas sin dientes, 4) tijeras rectas finas, 5) disectores de metal, 6) separadores de metal, 7) legra para hueso, 8) aspirador de sangre y moco, 9) tijeras mayo rectas, 10) pinzas de disección con dientes, 11) porta agujas, 12) hilo y aguja para suturar.

5.1.2 Manejo preoperatorio

Se anestesia la rata con pentobarbital sódico a una dosis de 20mg/500gr de peso/intraperitoneal y se administra atropina (40µg/100gr de peso/subcutánea).

5.1.3 Cirugía

Al iniciar se rasura el pelo de la cara anterior del cuello. La rata se coloca en decúbito dorsal sobre la mesa de operaciones. Para intubar la tráquea se coloca la mesa de operaciones en un ángulo de 70°. Con ayuda del abatelenguas se sujeta entre los dedos índice y pulgar la lengua y se jala hacia afuera y

adelante. Con la ayuda del mandril se coloca la sonda traqueal y se comprueba que el catéter haya quedado en la vía aérea.

La cara anterior del cuello se limpia con cloruro de benzalconio y se hace una incisión de 2 a 3 cm sobre la línea media de la piel desde 1cm por atrás del borde inferior de la mandíbula hacia el mango del esternón. Se corta la fascia superficial que cubre a los músculos digástricos y esternohioideos. Usando como

referencia el tendón del músculo digástrico izquierdo, con los disectores de metal se hace una separación roma de las siguientes estructuras: vena yugular interna izquierda y cara interna del músculo masetero del mismo lado, músculo digástrico y conductos faringoesofágico y laringotraqueal. De este punto en adelante la cirugía se realiza bajo el microscopio estereoscópico con aumento de 7.5 o 10X. Con el separador curvo se jalan las estructuras internas y en el fondo de la cavidad aparecerá la nasofaringe. Para llegar al hueso basiesfenoides se rompe la

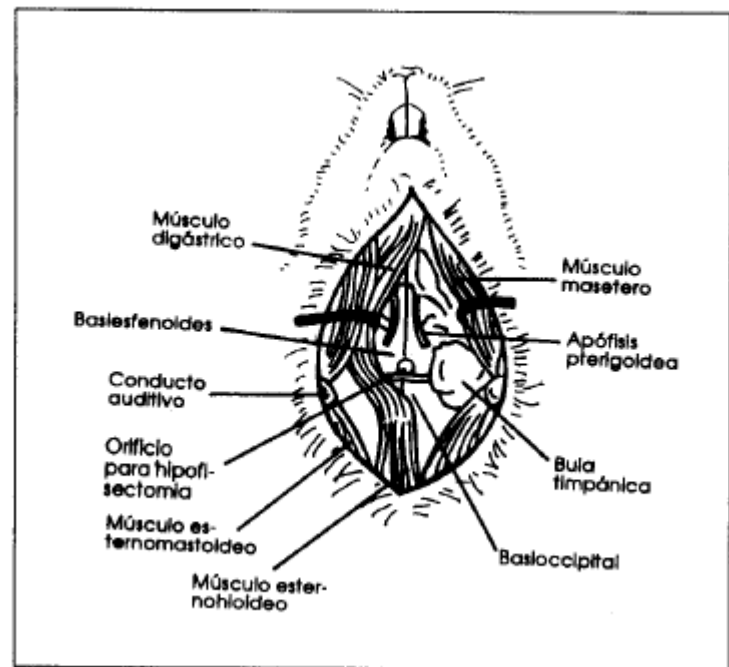


Figura 13. Esquema que representa los músculos del cuello y la zona de trepanación del cráneo para extirpar la hipófisis (Quintanar, 1994).

nasofaringe. Con el disector se raspa y se desprende del hueso la porción basal del músculo faríngeo; al hacer esto aparecerá una línea trasversal, generalmente de color azul claro que corresponde a la articulación esfeno-occipital (Figura 13). Tomando como referencia la articulación, se continúa limpiando el hueso hacia delante de la línea azul. Conforme se hace la disección la nasofaringe y las estructuras aledañas se van rechazando hacia la derecha con el separador.

Se procede a colocar los separadores de metal de tal modo que la herida quede lo suficientemente amplia y permita realizar con buena visibilidad las

maniobras posteriores. El número de separadores y el lugar de su localización dependerán de la visibilidad de la zona operatoria. Con la broca de bola se trepana el hueso basiesfenoides en la parte media e inmediatamente por encima de la línea azul, y hasta llegar a la duramadre teniendo cuidado de no romperla. Con la legra para hueso se levantan y desprenden los restos de la lámina interna del hueso; con la misma legra se redondean los bordes del orificio hasta que quede con un diámetro de 3mm aproximadamente. La hipófisis se transparenta en el fondo cubierta por la duramadre (Figura 14). Con la aguja para meninges se rompe la duramadre en forma de cruz. Para extraer la hipófisis se utiliza el aspirador de hipófisis conectado a la bomba de vacío. Para regular la fuerza del vacío se coloca un dedo en el orificio lateral del aspirador y con suavidad se aspira la hipófisis la cual debe salir completa.

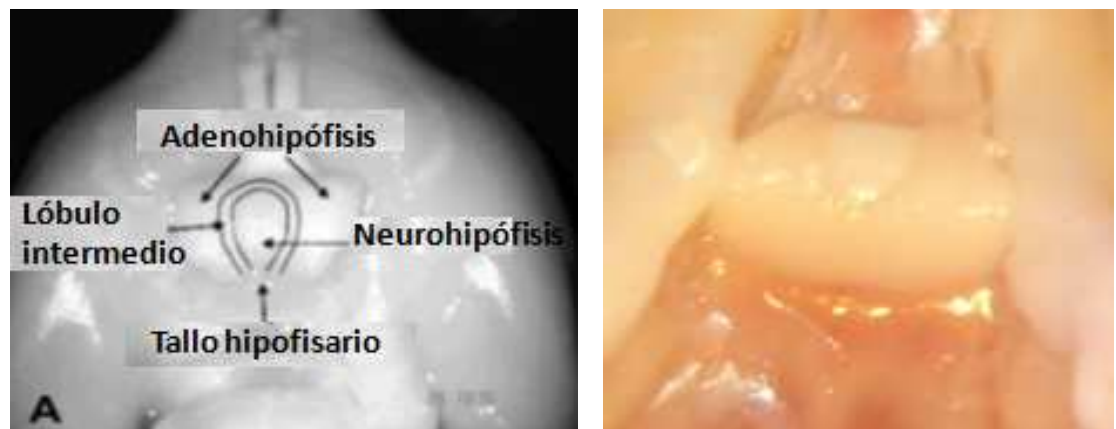


Figura 14. Vista al exponer la glándula hipófisis. Tomado y modificado de: "Hypophysectomy and neurointermediate pituitary lobectomy reduce serum immunoglobulin M (IgM) and IgG and intestinal IgA responses to *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection in rats".

j

Una vez que la hemorragia para, se aspira el coagulo y el moco acumulado en la parte nasal de la faringe. Posteriormente se procede a retirar los separadores de metal y a suturar la piel (Quintanar, 1994).

5.1.4 Cuidados postoperatorios

Antes de retirar la cánula traqueal se aspira el moco de la faringe a través del hocico y de la nasofaringe a través de los orificios nasales. Después de esto el animal es colocado en la cámara de recuperación la cual está formada con un colchón térmico y una tapa de fibra de vidrio. Por la parte lateral penetra un tubo conectado a una toma de gas carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂). Se inyectan 6000 UI de penicilina procaína IM cada 24 horas/3 días. Una vez recuperado el animal se pasa a su jaula y a la dieta normal se le agrega solución glucosada al 5% en el agua de beber (Quintanar, 1994).

5.2 Implante de adenohipófisis en cápsula renal

Las adenohipófisis para realizar los implantes provienen de hembras emparentadas con los machos receptores. Se implantaron 4 adenohipófisis por rata. Entre el momento que se obtiene la adenohipófisis de las hembras sacrificadas y la colocación del implante no pueden pasar más de 3 minutos.

5.2.1 Material e instrumental

Cuadro 6. Material e instrumental para implante de adenohipófisis en cápsula renal

Instrumental	Material
Bisturí	Mesa de cirugía
Pinza de disección fina sin dientes	Hilos para sujetar patas
Tijeras mayo curvas finas	Hilo y aguja para suturar
Pinza de disección fina con dientes	Rasuradora
Porta agujas	Microscopio estereoscópico con luz
Tijeras mayo rectas	Aguja 25* 5/8"
Trasplantadores de metal finos	Cámara de recuperación
	Oxígeno clínico
	Colchón térmico



Figura 15. Parte del instrumental utilizado para realizar los trasplantes de adenohipófisis a la cápsula renal. 1) bisturí, 2) pinza de disección con dientes, 3) pinza de disección fina sin dientes, 4) tijera mayo curva fina, 5) trasplantadores de metal finos, 6) porta agujas, 7) tijera mayo recta, 8) aguja para suturar.

5.2.2 Manejo preoperatorio

Se anestesia la rata con pentobarbital sódico a una dosis de 20mg/500gr de peso/intraperitoneal.

5.2.3 Cirugía

Se rasura el dorso de la rata a la altura de los riñones y se coloca en la mesa de cirugía en decúbito ventral. Se limpia la zona con cloruro de benzalconio y se hace una incisión de 2 a 3 cm sobre la línea media de la piel. Posteriormente se expone el riñón derecho dorsalmente y con la aguja de insulina se hace una pequeña incisión en la cápsula renal. Con los trasplantadores finos se forma un saco entre la cápsula y el riñón siendo muy cuidadosos para no romperla. Al tener listo el saco se colocan las adenohipófisis profundamente dentro de él, se regresa

el riñón a su posición original y se procede a suturar la herida dorsal (Figura 16) (Lombardero *et al.*, 2006).

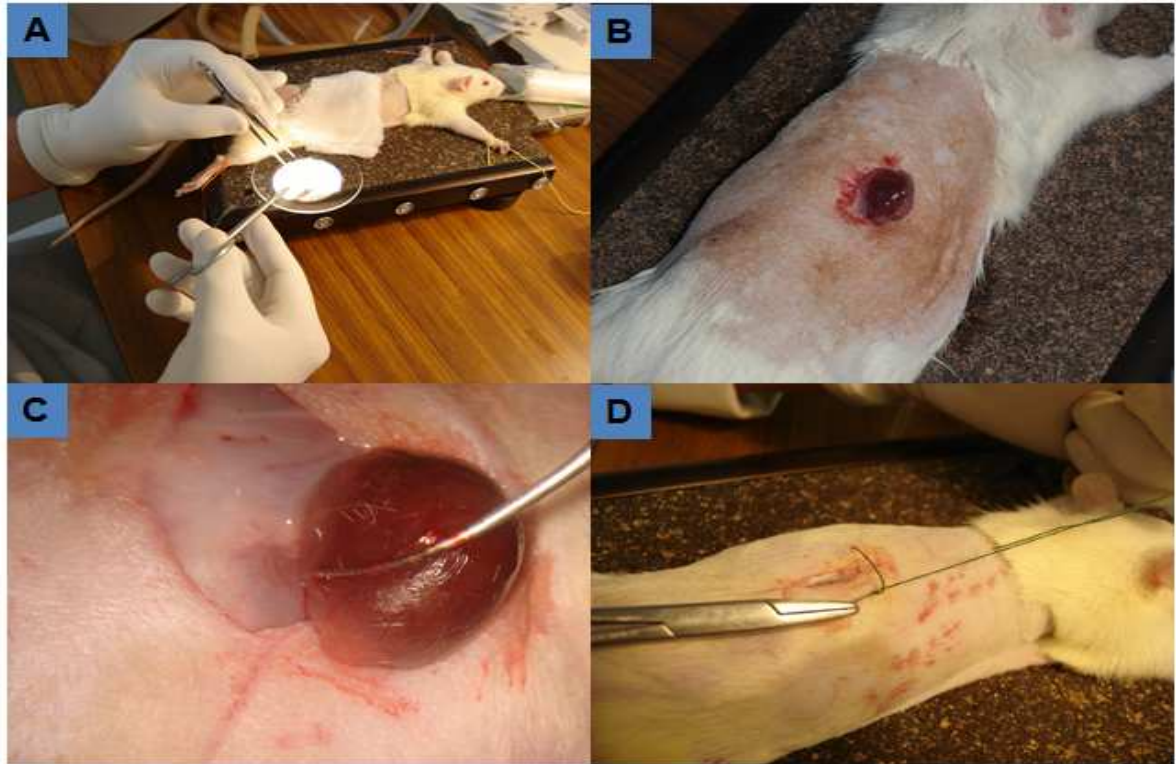


Figura 16. Implante de adenohipófisis en cápsula renal. A) Colocación de la rata en la cama de cirugía, b) exposición dorsal del riñón derecho, C) formación del saco en la cápsula renal, D) Sutura de la herida.

5.2.4 Cuidados postoperatorios

Al finalizar la cirugía se pone a la rata en la cámara de recuperación (O₂ clínico + colchón térmico). Se inyectan 5000UI de penicilina procainica IM cada 24 horas/3 días (inmediatamente después de la cirugía y dos días después).

5.3 Cirugía simulada (Sham) de hipofisectomía

Esta cirugía se realiza como se describió anteriormente (hipofisectomía), hasta llegar al momento de la trepanación del cráneo y visualización de la hipófisis. Después de visualizarla y sin retirarla, se aspira el moco acumulado en la parte nasal de la faringe y posteriormente se procede a retirar los separadores de

metal y a suturar la piel. Los cuidados postoperatorios son iguales a lo descrito anteriormente, sin la administración de solución glucosada en el agua de bebida.

5.4 Cirugía simulada (sham) de implante de adenohipófisis en cápsula renal

De igual forma, se realiza de acuerdo a lo previamente descrito (implante de adenohipófisis en cápsula renal) hasta llegar al punto de hacer la incisión sobre la cápsula renal. Después de realizar la incisión el riñón se regresa a su posición original y se sutura la piel. Los cuidados postoperatorios son los mismos.

6. Toma y procesamiento de las muestras

El sacrificio de los animales se realizó 25 días después de haber sido realizadas las cirugías mediante sobredosis de anestesia con sevoflurano (Sevorane®) con posterior decapitación. Al momento del sacrificio se obtuvo la sangre, el bazo, el hígado, los pulmones, el cerebro, el riñón derecho, los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) y periféricos (GLP). En el caso de los animales infectados se obtuvo la glándula mamaria por medio de un raspado del tejido subcutáneo del área correspondiente.

7. Digestión artificial

Al momento del sacrificio los pulmones, el cerebro y la glándula mamaria de los animales infectados se pesaron y maceraron, se tomó 1gr de tejido y se sometió a digestión artificial en 10 ml de una solución de pepsina (SIGMA®) y ácido clorhídrico al 1% por 24 horas. Pasadas las 24 horas se centrifugaron las muestras a 2500 rpm por 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se agregó 1ml de paraformaldehído al 4%. Para el conteo de parásitos se realizaron 10 conteos por muestra de 20µl cada uno, el total de larvas contadas se multiplicó por 50 para obtener el número de larvas por mililitro y a su vez el número de larvas por gramo de tejido, este número se multiplicó por el peso total del órgano y se obtuvo el número de larvas totales.

8. Citometría de flujo

Los bazos, los ganglios linfáticos mesentéricos y los ganglios linfáticos periféricos obtenidos al momento del sacrificio se disgregaron con una malla de nylon de 70 μm estéril y un émbolo de jeringa en PBS 1x amortiguado a pH 7.4 a 4°C. La suspensión celular obtenida fue centrifugada a 1200 rpm durante 3 minutos, se decantó el sobrenadante y se agregaron 500 μl de buffer de lisis de eritrocitos (sólo para el bazo) y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente, después se les agregó 700 μl de buffer de FACS y se centrifugaron nuevamente a 1200 rpm durante 3 minutos. Se decantaron y resuspendieron nuevamente en 500 μl de buffer de FACS para finalmente tomar 25 μl de cada muestra para la tinción.

Se colocaron 25 μl de muestra por pozo más 25 μl de paraformaldehído al 4% en placas de poliestireno de 96 pozos con fondo en "U" (Costar ®) y se dejaron incubar por 10 minutos a 37°C, después se centrifugó a 1000 rpm por 5 minutos, se decantó y se agregaron 200 μl de buffer de FACS para lavar y quitar los restos de paraformaldehído. Se volvió a centrifugar a 1200 rpm y se decantó, posteriormente se agregaron 150 μl de metanol absoluto y se incubó durante 10 minutos a 4°C. Después se centrifuga nuevamente a 2000 rpm por 3 minutos y se decanta para proceder a agregar 200 μl de buffer de FACS, volver a centrifugar (2000 rpm por 3 min) y decantar. Posteriormente se procedió a añadir 150 μl de los anticuerpos primarios en los pozos correspondientes, estos se dividieron en 3 tinciones (T1, T2, T3) y se incubaron por 10 minutos a 4°C.

- a) T1: CD3-Alexa 488, CD4-APCy5, CD8-PE + RPRL Sec Alexa 647
- b) T2: CD3-Alexa 488, CD45-PE + RPRL Sec Alexa 647
- c) T3: NK-APC, T $\gamma\delta$ -PE + RPRL Sec Alexa 488

Después de la incubación se agregaron 150 μl de buffer de FACS, se centrifugó (2000 rpm por 3 min) y se decantó para luego agregar 25 μl de los anticuerpos secundarios. Se volvieron a añadir 150 μl de buffer de FACS y la

placa se centrifugó y decantó. Para finalizar se resuspendió en 200 μ l de Buffer de FACS y se almacenó a 4°C en oscuridad total.

Para el análisis e interpretación de resultados se utilizó el programa FlowJo versión 7.6.

9. Determinación de los niveles séricos de anticuerpos específicos anti- *T. canis*

9.1 Producción de AgESTc



Figura 17. Equipo para realizar la concentración de los AgESTc.

Para la producción de AgESTc se cultivaron larvas en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) estéril y se colectó el sobrenadante de las cajas de cultivo por medio de aspiración. Este proceso se realizó semanalmente hasta obtener una cantidad considerable de sobrenadante el cual, posteriormente se concentró por medio de un equipo de filtración (AMICON) (Figura 17) con una membrana de 10000 Da. Al terminar de realizar la filtración de los sobrenadantes se determinó la concentración final de los antígenos mediante la técnica de Bradford (1976).

9.2 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Para realizar la técnica de Bradford se prepararon diluciones en PBS 1x de los AgESTc que se mezclaron con reactivo de Bradford. La concentración de proteína se determinó comparando la densidad óptica (D.O) de la muestra en una curva patrón realizada con Albúmina sérica bovina (BSA de SIGMA). Las concentraciones preparadas fueron; 10, 20, 40, 60, 80 y 100 μ g/ml. La concentración de antígenos totales obtenidas en la prueba fue de 357.48 mg/ml.

9.3 Electroforesis de AgES obtenidos a partir de medios de cultivo de L2 de *T. canis*

Los AgES de L2 de *T. canis* fueron separados por electroforesis utilizando SDS-PAGE en sistema discontinuo (gel concentrador al 4% y gel separador al 12%). Se utilizó la cámara para electroforesis Mini-Protean II Electrophoresis cell (Bio-Rad Labs). Las muestras se mezclaron con buffer reductor de Laemmli en una relación 1:1 y se sometieron a baño maría durante 2 minutos. De esta mezcla se colocaron 4.5 µg por pozo. Las constantes del corrimiento fueron 150 voltios y 120 miliamperes para el gel concentrador y 150 voltios y 80 miliamperes para el gel separador. Todo el corrimiento se realizó en cámara fría y las proteínas en el gel fueron visualizadas con la tinción de azul de Coomassie.

9.4 Ensayo inmunoenzimático para la determinación de IgG específica a *T. canis*

Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos con fondo plano (Maxisorp, NUNC Labs) sensibilizadas con 1mg/ml de AgESTc durante 24 horas a 4°C. Posteriormente las placas fueron lavadas tres veces con PBS1x-Tween 20 al 0.01%, se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 3% y se conservaron a 4°C por 24 horas. Pasado el tiempo del bloqueo se realizaron tres lavados PBS-Tween 20 al 0.01% y se almacenaron hasta su uso a 4°C. Para cada muestra se utilizaron por duplicado 50µl por pozo en una dilución 1:200 del suero con PBS 1X y se incubaron a 37°C por dos horas. Pasadas las dos horas, las placas fueron lavadas tres veces con PBS-Tween 20 al 0.01%, a cada pozo se le adicionaron 50µl de conjugado IgG de rata a una dilución de 1:10,000 y se colocaron en incubación a 37°C por una hora. Las placas se lavaron 5 veces con la misma solución (PBS-Tween 20 al 0.01%) y el desarrollo del color se realizó con OPD al 0.05% y peróxido de hidrógeno al 0.001% en solución reguladora de citratos. Se incubó por quince minutos en obscuridad total a 37°C y posteriormente se adicionaron 50 µl por pozo de ácido ortofosfórico al 0.06%. La lectura de las

placas se realizó a 492 nm con 15 segundos de agitación en el lector de ELISA (Multiscan Ascent).

10. Procesamiento de órganos para tinción con Hematoxilina-Eosina

Se tomaron porciones de pulmón, hígado, riñón y glándula mamaria de aproximadamente 2 cm, los órganos fueron lavados con PBS 1x y posteriormente fueron perfundidos con PBS1x-Paraformaldehído 4% amortiguado a un pH de 7.4 durante 24 horas. Después de esto, los tejidos se deshidrataron en un tren de alcoholes del 30%, 50%, 60%, 70% 80%, 90%, 96% y alcohol absoluto, fueron aclarados en xilol y se mantuvieron en parafina durante al menos 24 horas antes de ser colocados en el anillo de inclusión con parafina.

Los cortes histológicos se realizaron con navajas de bajo perfil en el micrótopo a 4 micras, se montaron en laminillas previamente tratadas con alcohol-ácido y una solución de polilisina 1:10. Se desparafinaron en la estufa a 60°C y se procesaron en un tren con los reactivos para la tinción con hematoxilina-eosina: xilol, alcohol absoluto, alcohol al 70%, 50%, 30%, agua destilada, hematoxilina, agua corriente, hidróxido de amonio al 0.5%, agua corriente, eosina, alcohol al 30%, 50%, 70%, alcohol absoluto y xilol, se fijaron con resina. Se observaron al microscopio a un aumento 10X y 20X.

11. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de las cargas parasitarias, de los títulos de anticuerpos específicos y de las subpoblaciones celulares del sistema inmunológico se muestran en gráficas de columnas de barras, señalando la media y la desviación estándar. Se evaluaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de dos factores (2-way ANOVA) y una comparación múltiple de Bonferroni entre todos los grupos. Los datos se muestran como la media + la desviación estándar. Se consideró diferencia significativa cuando $P < 0.05$; se utilizó el programa GraphPad Prism versión 6.0.

12. Diseño experimental

La secuencia de actividades para la realización del presente trabajo se presenta en la figura 18. La determinación de los niveles de IgG específica se realizó mediante el uso del suero obtenido al momento del sacrificio. Los bazo, GLM y GLP se procesaron para realizar citometría de flujo, la glándula mamaria, el cerebro y el pulmón para conteos de larvas. Finalmente al hígado, al riñón y al pulmón se les realizaron cortes para tinciones con H-E (Figura 18).

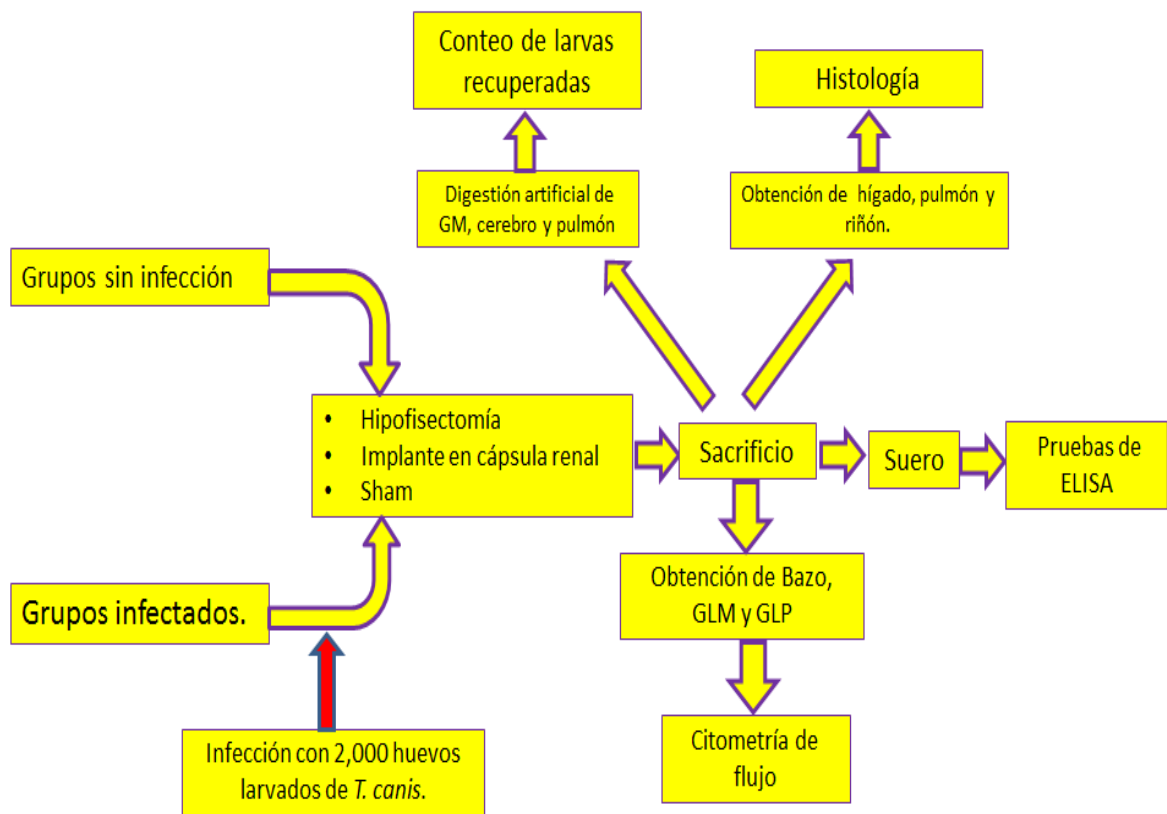


Figura 18. Metodología para la obtención de los distintos órganos y tejidos utilizados para la realización del experimento.

RESULTADOS

1. Número total de larvas en pulmón, cerebro y glándula mamaria

Para evaluar el efecto de la PRL sobre la migración de las larvas, se determinaron las cargas parasitarias en pulmón, cerebro y glándula mamaria. No se recuperaron larvas de glándula mamaria en ninguno de los grupos experimentales, por otra parte, solo se observó una disminución estadísticamente significativa ($P < 0.001$) de aproximadamente el 50%, en el número de larvas recuperadas de pulmón, en los animales hipofisectomizados (Figura 19). Los porcentajes de recuperación larval en los pulmones a los 70 días post-infección fueron; a) intactos: 3.18%, b) Sh-Hpx: 2.9%, c) Hpx: 1.42%, d) Sh-HPRL: 2.34% y e) HPRL 3.25%. En el cerebro los porcentajes fueron; a) intactos: 4.35%, b) Sh-Hpx: 2.91%, c) Hpx: 2.56 %, d) Sh-HPRL: 2.74% y e) HPRL: 2.8%.

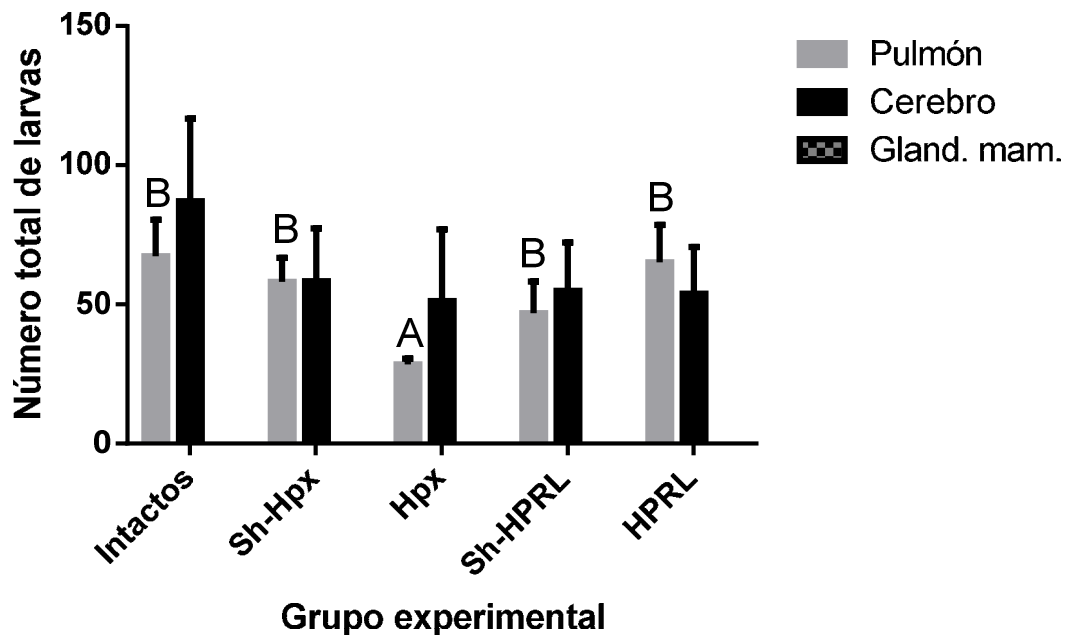


Figura 19. Número total de larvas recuperadas por medio de digestión artificial en pulmón, cerebro y glándula mamaria de ratas macho infectadas con *T. canis*. No se recuperaron larvas de glándula mamaria. Los datos representan la media \pm la desviación estándar. $P < 0.001$. Sh-Hpx; ratas con cirugía simulada de hipofisectomía, Hpx; ratas hipofisectomizadas, Sh-HPRL; ratas con cirugía simulada de implante de adenohipófisis en la cápsula renal, HPRL; ratas con Implantes de adenohipófisis en cápsula renal.

2. Análisis de las subpoblaciones celulares del sistema inmunológico

Con la finalidad de determinar el efecto de la infección y de la PRL sobre el sistema inmunológico, se evaluaron las principales células encargadas de montar la respuesta inmune contra el parásito *T. canis* (linfocitos T totales (CD3+), linfocitos T cooperadores (CD4+), linfocitos T citotóxicos (CD8+), Linfocitos B (CD45+), células NK (CD161+) y linfocitos T $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta$ +). Además de lo anterior, se determinó sobre esas subpoblaciones celulares, la expresión relativa del receptor a prolactina (RPRL), utilizando la intensidad media de fluorescencia (IMF).

2.1 Porcentajes de linfocitos T totales (CD3+) en Bazo, GLP y GLM

La subpoblación de linfocitos T totales (CD3+) en el bazo mostró una disminución ($P < 0.001$) en el grupo de ratas HPRL no infectadas, pero, al momento de ser infectados, esa disminución se ve compensada y se igualan los porcentajes con respecto a los demás grupos experimentales (Figura 20).

En los GLP, no se observan diferencias significativas asociadas a los tratamientos, pero si se observa un incremento en las proporciones de estas células en los grupos Sh-Hpx ($P < 0.001$) y Sh-HPRL ($P < 0.001$) ocasionado por la infección (Figura 20).

Por otra parte, en los GLM del grupo Hpx no infectado, se observó un aumento ($P < 0.05$) en la proporción de linfocitos CD3+ mientras que, en los grupos Sh-Hpx y Sh-HPRL sin infección hay una disminución ($P < 0.001$) en la proporción de los mismos. En los dos grupos anteriores hubo aumentos en los porcentajes debidos a la infección al igual que en el grupo HPRL (Figura 20).

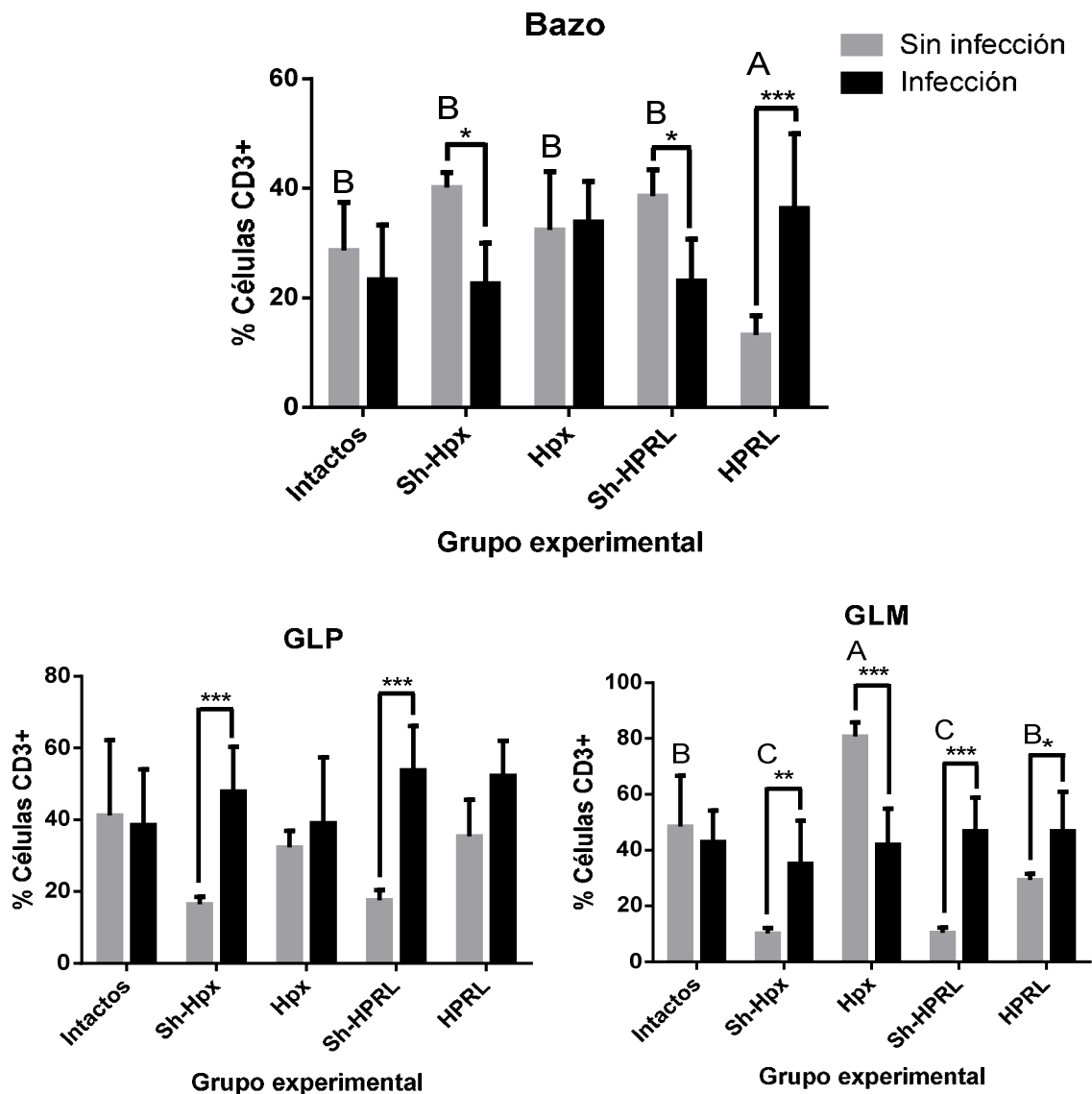


Figura 20. Porcentaje de linfocitos T totales (CD3+) en bazo, GLP y GLM provenientes de ratas con y sin infección. Los datos representan la media \pm la desviación estándar. Los * muestran las diferencias significativas (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) debidas al efecto de la infección y las letras (A, B, C) muestran las diferencias significativas ($P < 0.05$) ocasionadas por efecto de los tratamientos (cirugías). Sh-Hpx; ratas con cirugía simulada de hipofisectomía, Hpx; ratas hipofisectomizadas, Sh-HPRL; ratas con cirugía simulada de implante de adenohipófisis en la cápsula renal, HPRL; ratas con Implantes de adenohipófisis en cápsula renal.

2.1.1 Expresión del RPRL en linfocitos T totales (CD3+) obtenidos de Bazo, GLP y GLM

La subpoblación de linfocitos T totales que expresan el receptor de prolactina (RPRL+) en el bazo de las ratas de los grupos Sh-Hpx y Sh-HPRL sin infección se vieron disminuidos, y solo se observó un incremento en la expresión debido a la infección en los animales intactos ($P < 0.05$) y Sh-Hpx ($P < 0.05$). En cuanto a la expresión relativa del receptor no se observaron cambios en los grupos sin infección. En las ratas infectadas, hay una disminución ($P < 0.001$) en los animales de los grupos Sh-Hpx, Hpx, Sh-HPRL y HPRL. Por otro lado, hubo incrementos ($P < 0.001$) en la expresión a causa de la infección en los grupos intactos, Hpx y HPRL (Figura 21).

En los GLP se observó un aumento ($P < 0.05$) en el porcentaje del grupo Hpx sin infección, mientras que hubo una disminución ($P < 0.01$) en el grupo HPRL. Respecto al efecto de la infección, hay un aumento en los porcentajes en los grupos intactos ($P < 0.01$) y Sh-HPRL ($P < 0.05$). Del mismo modo que en el bazo, los grupos sin infección no mostraron diferencias significativas en la expresión del RPRL, pero, en los grupos infectados, hubo una disminución ($P < 0.001$) en la expresión relativa del receptor en los tratamientos Sh-Hpx, Hpx, Sh-HPRL y HPRL. Por otra parte, el efecto de la infección ocasionó un aumento ($P < 0.05$) en la expresión relativa en todos los grupos (Figura 21).

En los GLM no se observaron cambios en los porcentajes de células, sin embargo, la expresión relativa disminuyó en el grupo HPRL ($P < 0.05$) y hubo un aumento debido a la infección en los grupos intactos ($P < 0.001$), Hpx ($P < 0.001$) y Sh-HPRL ($P < 0.01$) (Figura 21).

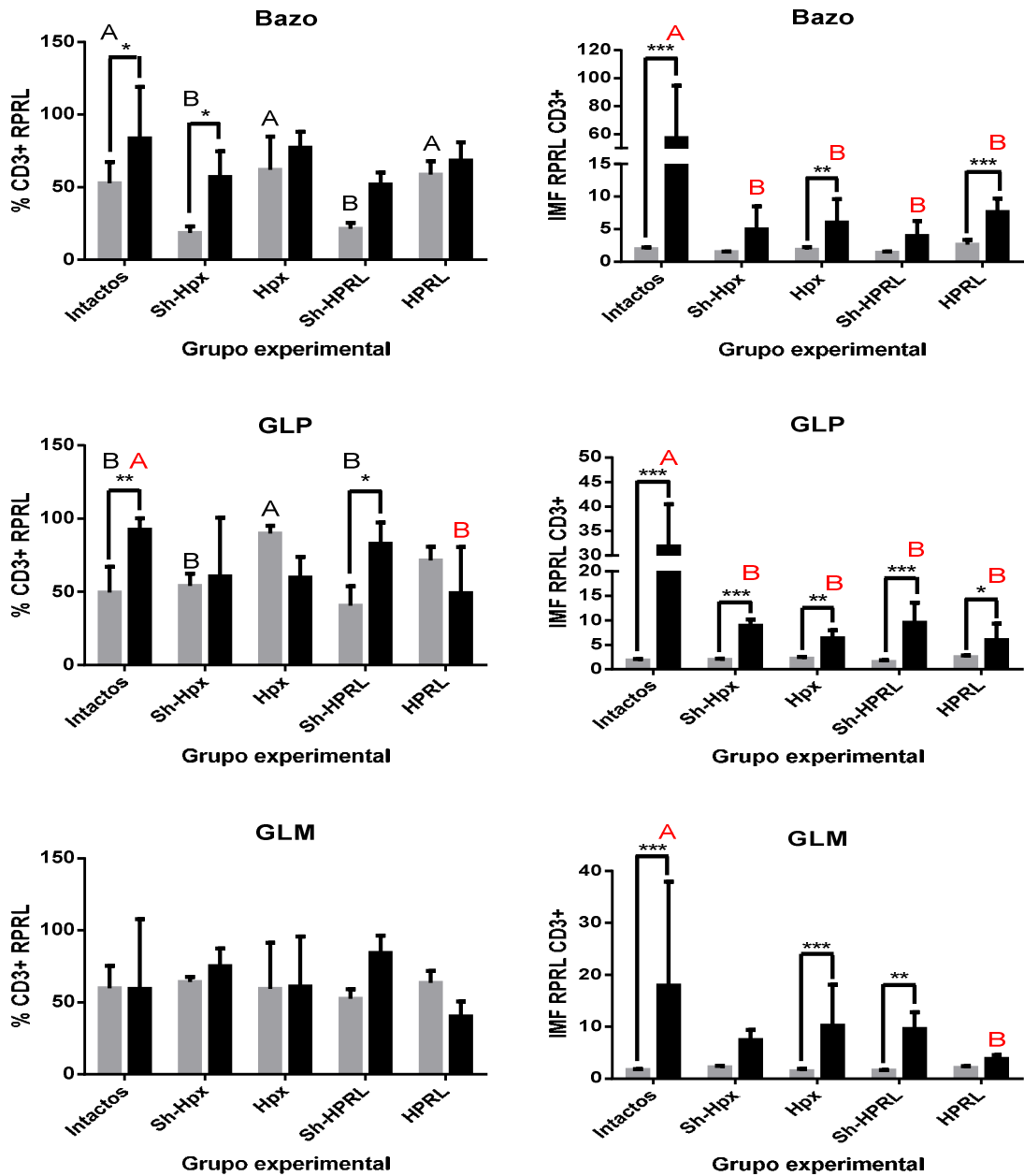


Figura 21. Porcentaje de linfocitos T totales (CD3+) RPRL+ e IMF en bazo, GLP y GLM provenientes de ratas con y sin infección. Los datos representan la media \pm la desviación estándar. Los * muestran las diferencias significativas ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $***P < 0.001$) debidas al efecto de la infección y las letras (A, B, C) muestran las diferencias significativas ($P < 0.05$) ocasionadas por efecto de los tratamientos (cirugías). Sh-Hpx; ratas con cirugía simulada de hipofisectomía, Hpx; ratas hipofisectomizadas, Sh-HPRL; ratas con cirugía simulada de implante de adenohipófisis en la cápsula renal, HPRL; ratas con Implantes de adenohipófisis en cápsula renal.**

2.2 Porcentaje de linfocitos T cooperadores (CD4+) en Bazo, GLP y GLM

No se observaron diferencias en los porcentajes de células obtenidas de bazo de las ratas de los grupos sin infección, mientras que en las ratas de los grupos infectados hubo una disminución ($P < 0.05$) en los porcentajes de estas células en los tratamientos Sh-Hpx, Hpx, Sh-HPRL y HPRL. También se mostraron aumentos ($P < 0.001$) en los porcentajes debidos a la infección en los bazos de los grupos intactos, Sh-Hpx y Sh-HPRL (Figura 22).

En los GLP no hubo diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los grupos sin infección, mientras que en los grupos Sh-Hpx, Sh-HPRL y HPRL infectados, hubo una disminución en los porcentajes de estas células. Por el contrario, en el grupo Hpx infectado hubo un aumento. En todos los grupos, la infección ocasionó aumento en las proporciones (Figura 22).

En el caso de los GLM no se encontraron diferencias significativas entre los grupos con y sin infección pero, en todos los casos la infección generó aumento en las proporciones celulares (Figura 22).

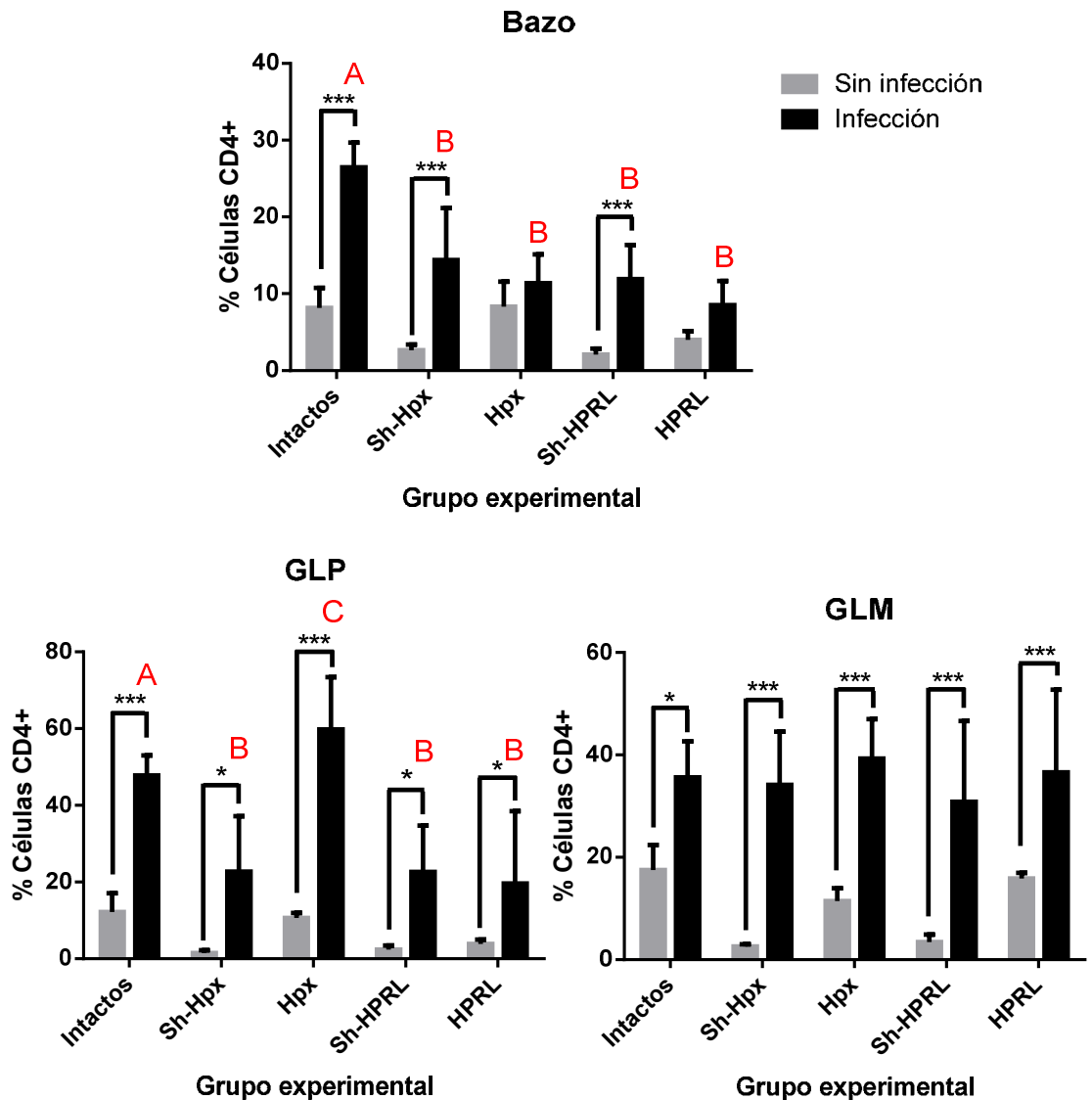


Figura 22. Porcentaje de linfocitos T cooperadores (CD4+) en bazo, GLP y GLM provenientes de ratas con y sin infección. Los datos representan la media \pm la desviación estándar. Los * muestran diferencias significativas (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) debidas al efecto de la infección y las letras (A, B, C) muestran las diferencias significativas ocasionadas por efecto de los tratamientos (cirugías). Sh-Hpx; ratas con cirugía simulada de hipofisectomía, Hpx; ratas hipofisectomizadas, Sh-HPRL; ratas con cirugía simulada de implante de adenohipófisis en la cápsula renal, HPRL; ratas con Implantes de adenohipófisis en cápsula renal.

2.2.1 Expresión del RPRL en linfocitos T cooperadores (CD4+) obtenidos de Bazo, GLP y GLM

La subpoblación de linfocitos T cooperadores que expresan el receptor de prolactina en bazo muestra diferencias significativas al comparar el grupo Hpx con los grupos Sh-Hpx y Sh-HPRL sin infección. Por otra parte, en los grupos infectados hay una disminución en las proporciones en los grupos Sh-Hpx, Sh-HPRL y HPRL. Además de lo anterior, la infección ocasiona un aumento en los grupos intactos y una ligera disminución en los grupos HPRL. La expresión relativa del receptor no muestra diferencias en los grupos sin infección y en los grupos infectados hay una disminución en los tratamientos Sh-Hpx, Hpx, Sh-HPRL y HPRL. Los cambios debidos a la infección se observan en los grupos intactos e Hpx, donde hay un aumento en la fluorescencia (Figura 23).

En los GLP se observa un aumento en la proporción en el grupo Hpx sin infección, mientras que, en los grupos Sh-Hpx, Sh-HPRL y HPRL infectados hay una disminución. También hay cambios significativos debidos a la infección en los grupos intactos. No hay cambios significativos ($P>0.05$) en la expresión del receptor en los grupos sin infección y se observa una disminución en los distintos tratamientos de los grupos infectados (Sh-Hpx, Hpx, Sh-HPRL y HPRL) (Figura 23).

No se observaron cambios significativos en los porcentajes de linfocitos T cooperadores RPRL+ en GLM tanto entre animales no infectados vs infectados como entre los distintos tratamientos. En la expresión del receptor no se observaron diferencias significativas ($P>0.05$) entre los grupos sin infección, mientras que en los animales infectados solo se observó una disminución de células CD4+ en los GLM de las ratas de los grupos Sh-Hpx, Sh-HPRL y HPRL al compararlos con el grupo Hpx. También hay un efecto de la infección en los grupos intactos ($P<0.01$) e Hpx ($P<0.001$), en los cuales se observó un aumento en esta subpoblación (Figura 23).

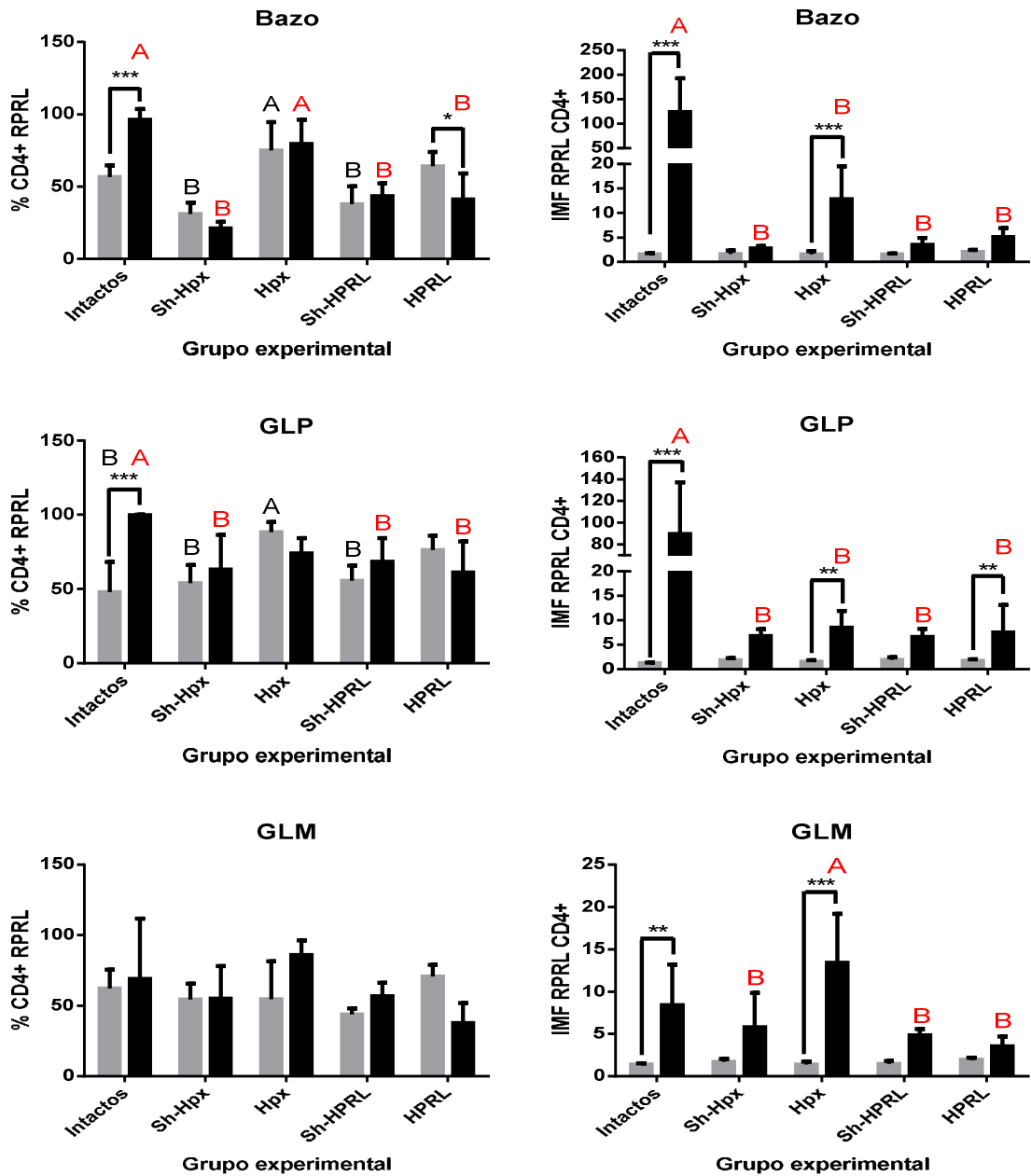


Figura 23. Porcentaje de linfocitos T cooperadores (CD4+) RPRL+ e IMF en bazo, GLP y GLM provenientes de ratas con y sin infección. Los datos representan la media \pm la desviación estándar. Los * muestran diferencias significativas ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $***P < 0.001$) debidas al efecto de la infección y las letras (A, B, C) muestran las diferencias significativas ocasionadas por efecto de los tratamientos (cirugías). Sh-Hpx; ratas con cirugía simulada de hipofisectomía, Hpx; ratas hipofisectomizadas, Sh-HPRL; ratas con cirugía simulada de implante de adenohipófisis en la cápsula renal, HPRL; ratas con Implantes de adenohipófisis en cápsula renal.**

2.3 Porcentaje de linfocitos T citotóxicos (CD8+) en Bazo, GLP y GLM

En el bazo no se encontraron diferencias entre los grupos sin infección ($P>0.05$). En los grupos con infección se observó un aumento en los porcentajes de los tratamientos Sh-Hpx, Hpx, Sh-HPRL y HPRL. El efecto debido a la infección sobre estas células se observó en los grupos Hpx y HPRL (Figura 24).

En el caso de los GLP no se observaron diferencias en los porcentajes de células CD8+ entre los diferentes tratamientos de los grupos con y sin infección, solo se observaron diferencias en los porcentajes de estas células que fueron debidas a la infección en los grupos Sh-Hpx, Sh-HPRL y HPRL (Figura 24).

Tampoco se vieron cambios significativos en los GLM de los grupos de ratas sin infección, por otra parte, en los animales infectados se observa un aumento ($P<0.001$) en el porcentaje de la subpoblación CD8+ en los grupos Sh-Hpx, Sh-HPRL y HPRL. Los cambios debidos a la infección se presentan en los grupos Sh-Hpx, Sh-HPRL y HPRL (Figura 24).

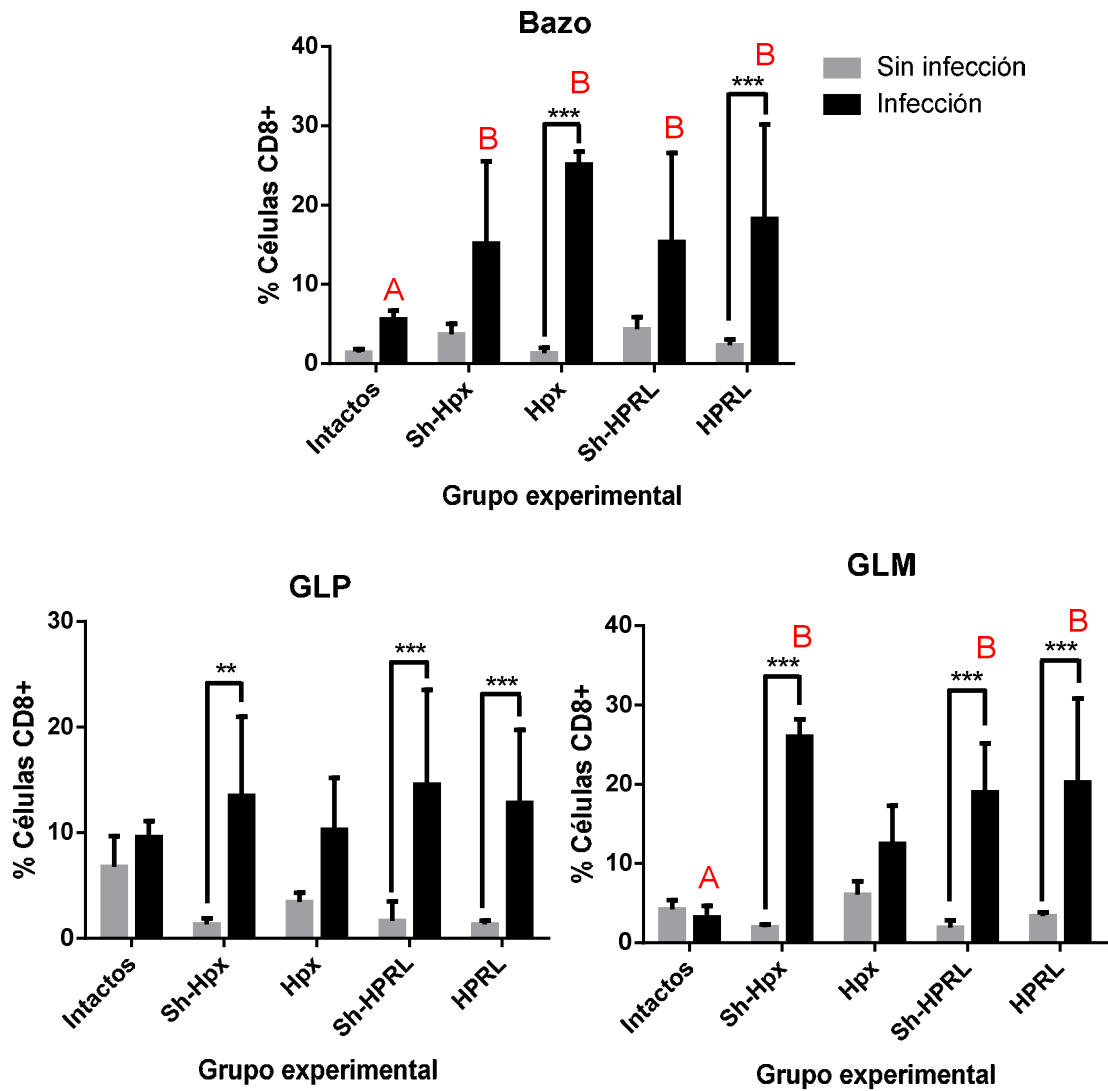


Figura 24. Porcentaje de linfocitos T citotóxicos (CD8+) en bazo, GLP y GLM provenientes de ratas con y sin infección. Los datos representan la media \pm la desviación estándar. Los * muestran diferencias significativas ($P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$) debidas al efecto de la infección y las letras (A, B, C) muestran las diferencias significativas ocasionadas por efecto de los tratamientos (cirugías). Sh-Hpx; ratas con cirugía simulada de hipofisectomía, Hpx; ratas hipofisectomizadas, Sh-HPRL; ratas con cirugía simulada de implante de adenohipófisis en la cápsula renal, HPRL; ratas con Implantes de adenohipófisis en cápsula renal.

2.3.1 Expresión del RPRL en linfocitos T citotóxicos (CD8+) obtenidos de Bazo, GLP y GLM

Los resultados muestran que no existen diferencias en el porcentaje de linfocitos T citotóxicos RPRL+ en el bazo de las ratas de los grupos infectados, sin embargo, en el bazo las ratas de los grupos sin infección se observa una disminución ($P < 0.001$) en los grupos SH-Hpx y Sh-HPRL. Los cambios debidos a la infección se notan en los grupos intactos, Sh-Hpx, SH-HPRL y HPRL. No se observan cambios significativos ($P > 0.05$) en la expresión relativa del RPRL en los grupos sin infección pero, si se pueden notar un aumento ($P < 0.001$) en la expresión debido a la infección en los grupos intactos, Hpx y HPRL (Figura 25).

En los linfocitos T citotóxicos RPRL+ de GLP no se observan cambios en los grupos infectados, pero si hay cambios debidos a la infección en los grupos intactos, Sh-Hpx, Sh-HPRL y HPRL. En la expresión relativa del receptor en estas células, existen diferencias en todos los grupos que son debidas a la infección (Figura 25).

En el caso de los GLM hubo diferencias significativas ($P < 0.001$) en los porcentajes que son debidas a la infección en los grupos intactos e Hpx. En cuanto a la expresión relativa del receptor se observa un incremento debido a la infección en los grupos intactos, Sh-Hpx, Hpx y Sh-HPRL, siendo más evidente este aumento en el grupo Hpx (Figura 25).

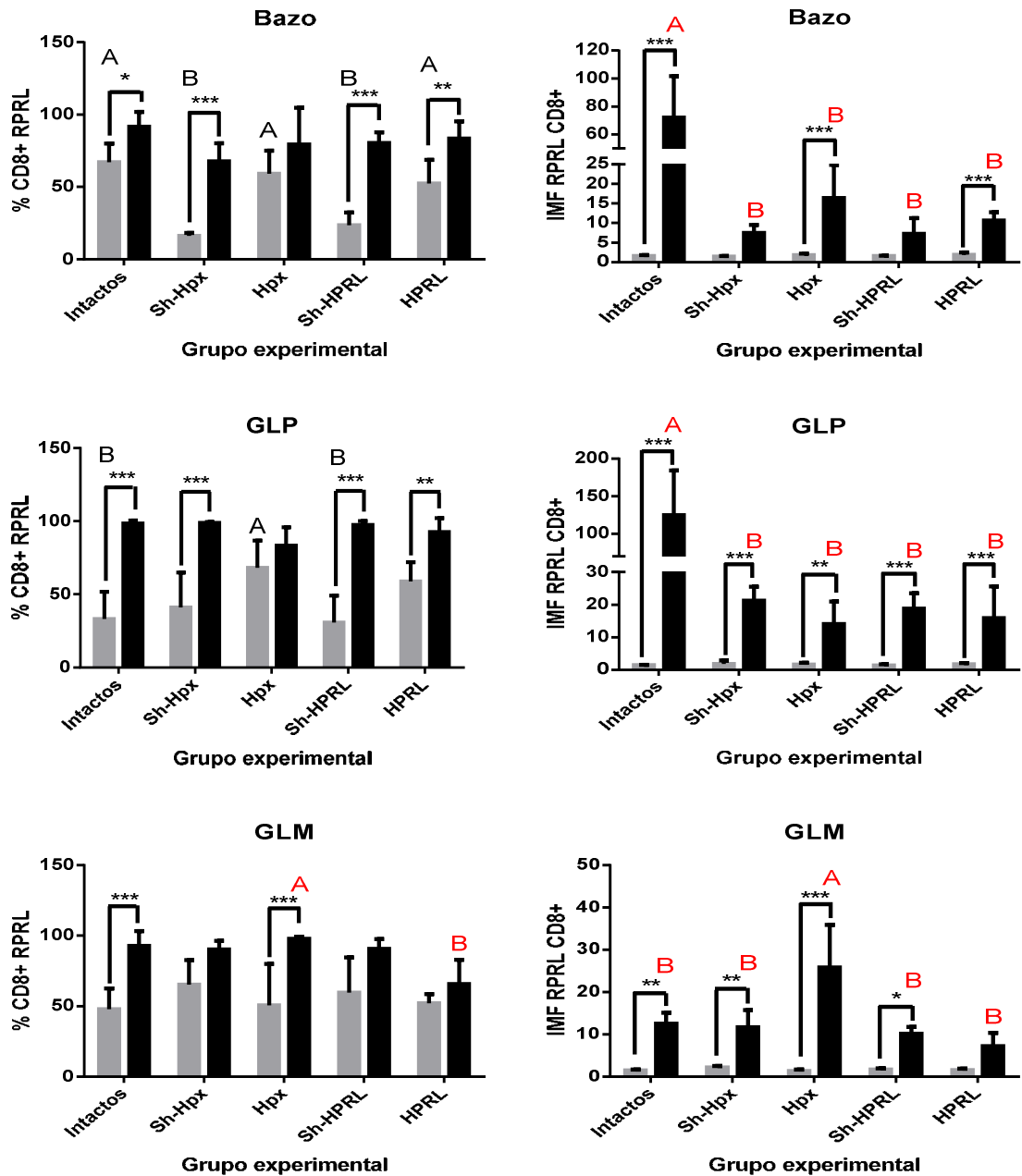


Figura 25. Porcentaje de linfocitos T citotóxicos (CD8+) RPRL+ e IMF en bazo, GLP y GLM provenientes de ratas con y sin infección. Los datos representan la media \pm la desviación estándar. Los * muestran diferencias significativas ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $***P < 0.001$) debidas al efecto de la infección y las letras (A, B, C) muestran las diferencias significativas ocasionadas por efecto de los tratamientos (cirugías). Sh-Hpx; ratas con cirugía simulada de hipofisectomía, Hpx; ratas hipofisectomizadas, Sh-HPRL; ratas con cirugía simulada de implante de adenohipófisis en la cápsula renal, HPRL; ratas con Implantes de adenohipófisis en cápsula renal.**

2.4 Porcentaje de Linfocitos B (CD45+) en Bazo, GLP y GLM

Tanto en el bazo, como en los GLP y en los GLM se observan incrementos en los porcentajes ($P < 0.001$) debidos a la infección, en la proporción de células CD45+ en los grupos intactos, Hpx y HPRL. También se observan aumentos ($P < 0.001$) en los tratamientos Sh-Hpx y Sh-HPRL en los grupos no infectados (Figura 26).

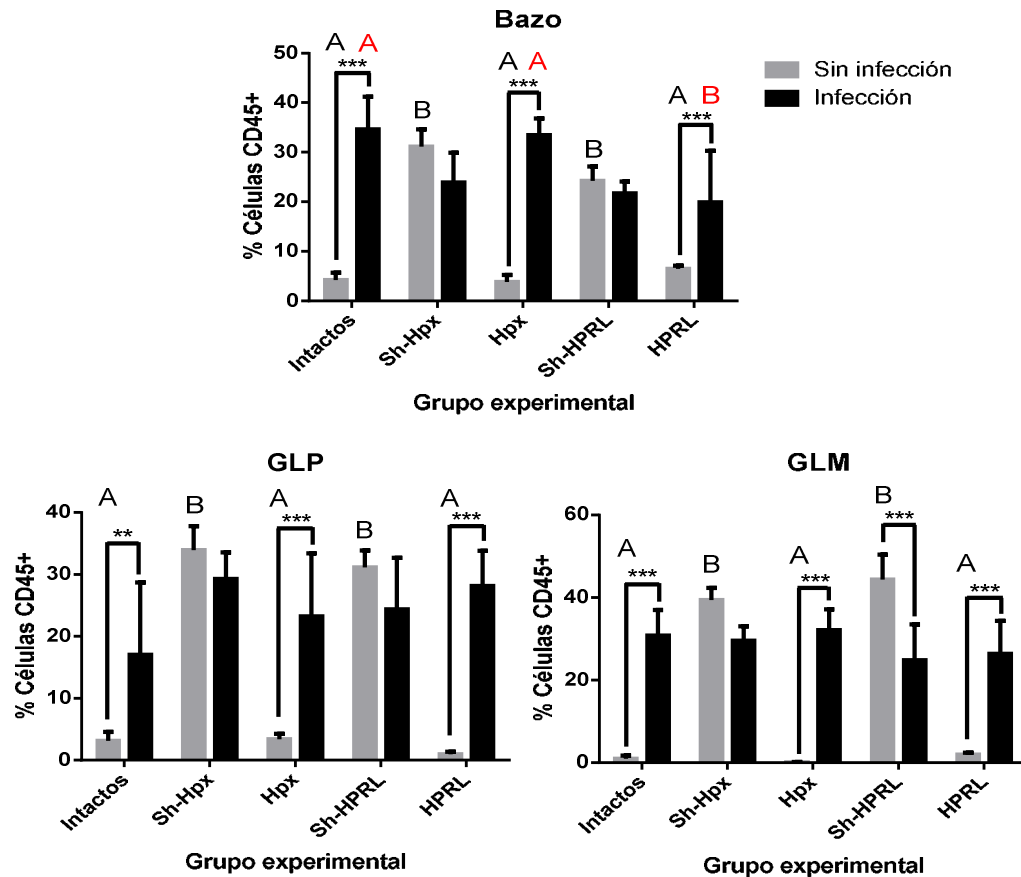


Figura 26. Porcentaje de linfocitos B (CD45+) en bazo, GLP y GLM provenientes de ratas con y sin infección. Los datos representan la media \pm la desviación estándar. Los * muestran diferencias significativas ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$) debidas al efecto de la infección y las letras (A, B, C) muestran las diferencias significativas ocasionadas por efecto de los tratamientos (cirugías). Sh-Hpx; ratas con cirugía simulada de hipofisectomía, Hpx; ratas hipofisectomizadas, Sh-HPRL; ratas con cirugía simulada de implante de adenohipófisis en la cápsula renal, HPRL; ratas con Implantes de adenohipófisis en cápsula renal.

2.4.1 Expresión del RPRL en linfocitos B (CD45+) obtenidos de Bazo, GLM y GLP

Con respecto a la expresión del RPRL en linfocitos B, existe un incremento en el porcentaje en las células obtenidas de bazo en los grupos intactos ($P < 0.01$) y HPRL ($P < 0.001$) que se debe a la infección. En cuanto a la expresión relativa del RPRL, hay diferencias significativas en los grupos intactos, Hpx y HPRL que son debidas al efecto de la infección (Figura 27).

En los GLP se observa un aumento en el porcentaje en los grupos intactos y HPRL causado por la infección, y en la expresión relativa del receptor hay aumentos en los grupos intactos, Hpx, Sh-HPRL y HPRL (Figura 27).

En los GLM existen aumentos ($P < 0.001$) en los porcentajes debidos a los tratamientos en los grupos Sh-Hpx y Sh-HPRL no infectados, mientras que en los grupos infectados, hay una disminución ($P < 0.05$) en el grupo HPRL. Los cambios generados por la infección se observan en los grupos intactos ($P < 0.001$) e Hpx ($P < 0.01$). En cuanto a la expresión relativa del receptor hay cambios significativos ($P < 0.001$) debidos a la infección en los grupos intactos e Hpx. Entre los cambios ocasionados por el tratamiento, solo se observa en los grupos Sh-HPRL y HPRL donde hay una disminución (Figura 27).

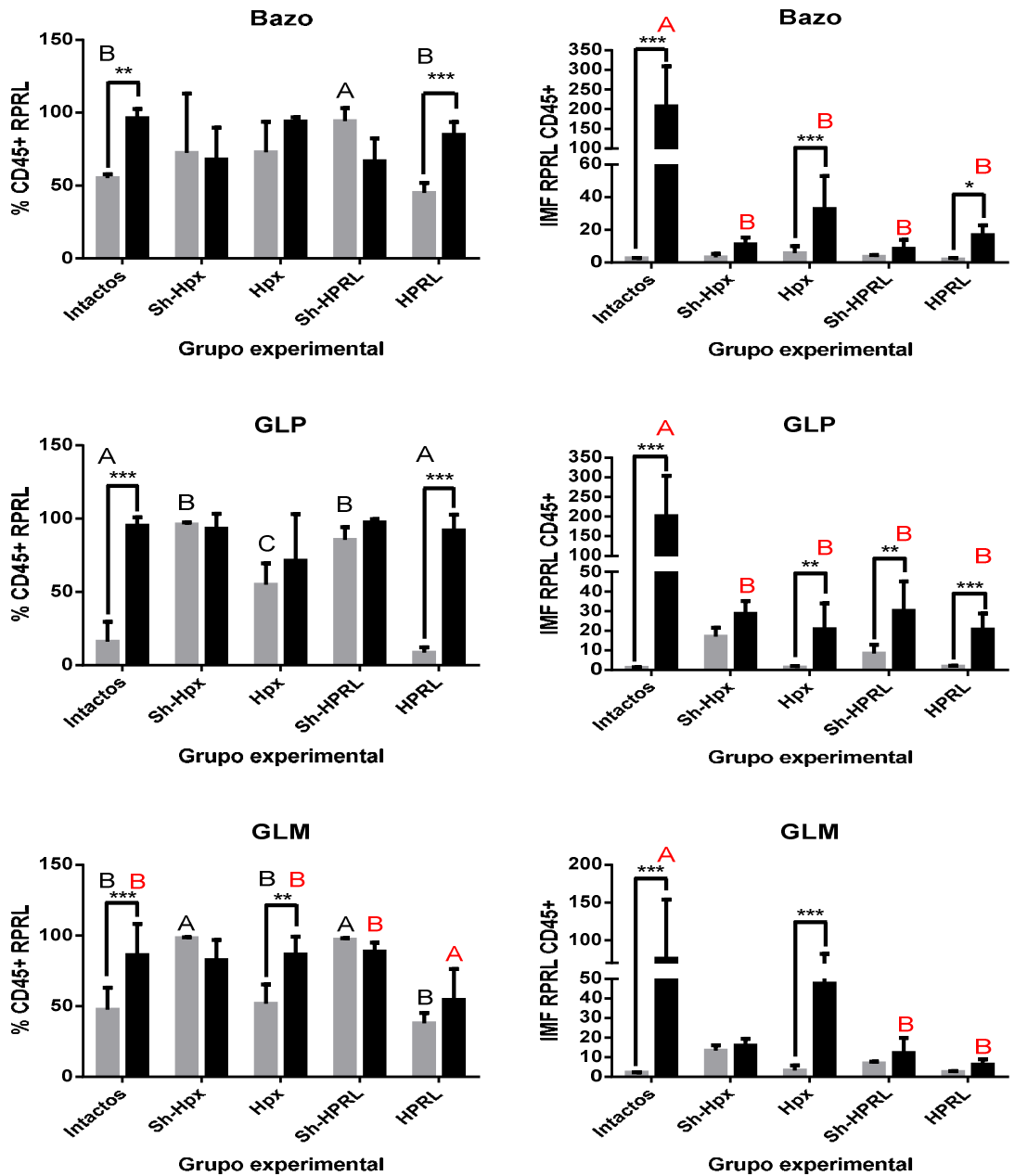


Figura 27. Porcentaje de linfocitos B (CD45+) RPRL+ e IMF en bazo, GLP y GLM provenientes de ratas con y sin infección. Los datos representan la media \pm la desviación estándar. Los * muestran diferencias significativas (* P <0.05, ** P <0.01, * P <0.001) debidas al efecto de la infección y las letras (A, B, C) muestran las diferencias ocasionadas por efecto de los tratamientos (cirugías). Sh-Hpx; ratas con cirugía simulada de hipofisectomía, Hpx; ratas hipofisectomizadas, Sh-HPRL; ratas con cirugía simulada de implante de adenohipófisis en la cápsula renal, HPRL; ratas con Implantes de adenohipófisis en cápsula renal.**

2.5 Porcentaje de células NK (CD161+) en Bazo, GLP y GLM

Las diferencias en los porcentajes de células NK debidas a la infección en el bazo se presentan en el grupo intacto, donde hay un aumento ($P < 0.01$) en el porcentaje y en el grupo Hpx, en el cual hay una disminución ($P < 0.05$). Los cambios debidos al tratamiento en los grupos de animales no infectados se pueden observar en los grupos Sh-Hpx, Sh-HPRL y HPRL en los cuales hay una disminución en los porcentajes. En los grupos de animales infectados también hay cambios debidos al tratamiento, los grupos Sh-Hpx, Hpx, Sh-HPRL y HPRL muestran una disminución ($P < 0.001$) en el porcentaje respecto a su control (Figura 28).

En los GLP hay un aumento ($P < 0.001$) en los porcentajes debidas a la infección en los grupos Sh-Hpx y Sh-HPRL. En los animales sin infección hubo cambios en los grupos Sh-Hpx y Sh-HPRL, donde disminuyeron los porcentajes (Figura 28).

Los cambios en la subpoblación proveniente de los GLM que fueron debidos a la infección se presentaron en los grupos intactos e Hpx, donde hubo un aumento en los porcentajes ($P < 0.001$), mientras que las diferencias debidas a los tratamientos solo se observaron en los grupos Sh-Hpx, Hpx, Sh-HPRL y HPRL infectados (Figura 28).

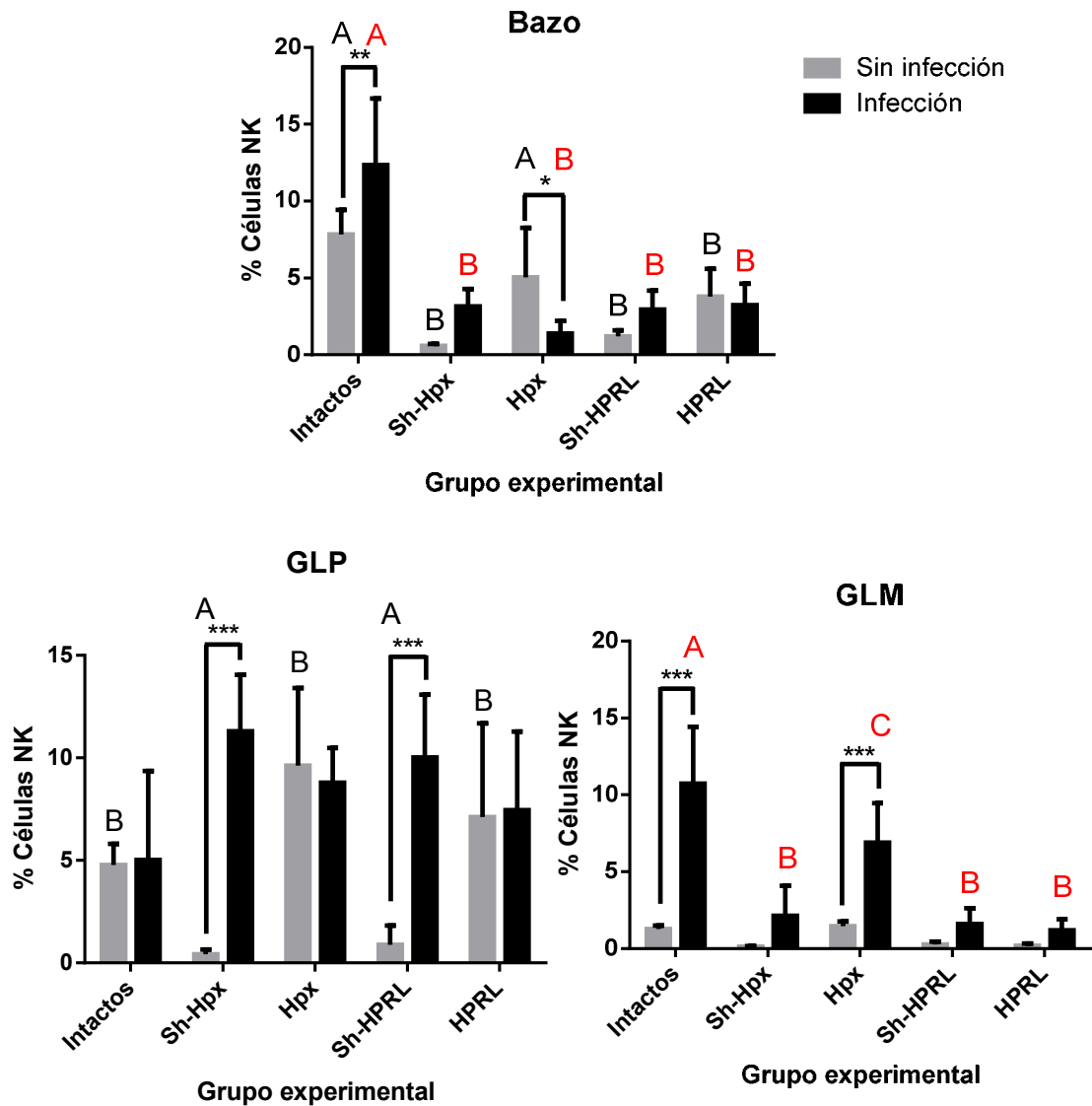


Figura 28. Porcentaje de células NK (CD161+) en bazo, GLP y GLM provenientes de ratas con y sin infección. Los datos representan la media \pm la desviación estándar. Los * muestran diferencias significativas (* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001) debidas al efecto de la infección y las letras (A, B, C) muestran las diferencias significativas ocasionadas por efecto de los tratamientos (cirugías). Sh-Hpx; ratas con cirugía simulada de hipofisectomía, Hpx; ratas hipofisectomizadas, Sh-HPRL; ratas con cirugía simulada de implante de adenohipófisis en la cápsula renal, HPRL; ratas con Implantes de adenohipófisis en cápsula renal.

2.5.1 Expresión del RPRL en células NK (CD161+) obtenidas de Bazo, GLM y GLP

No se observaron diferencias debidas a la infección en el porcentaje de células NK RPRL+ provenientes de bazo. Se observa un aumento en la en la expresión relativa del receptor debido a la infección en los grupos intactos, además de diferencias significativas debidas al tratamiento en los grupos Sh-Hpx, Hpx, Sh-HPRL y HPRL infectados (Figura 29).

En los GLP de los grupos no infectados se observa un aumento ($P < 0.001$) en los porcentajes debido al tratamiento en los grupos Sh-Hpx y Sh-HPRL, mientras que, solo hubo cambios debidos a la infección en el grupo Sh-Hpx, en el cual hubo una disminución ($P < 0.05$) (Figura 29).

No existieron diferencias ($P > 0.05$) tanto en el porcentaje de células RPRL+ como en la expresión relativa del receptor en las células provenientes de GLM (Figura 29).

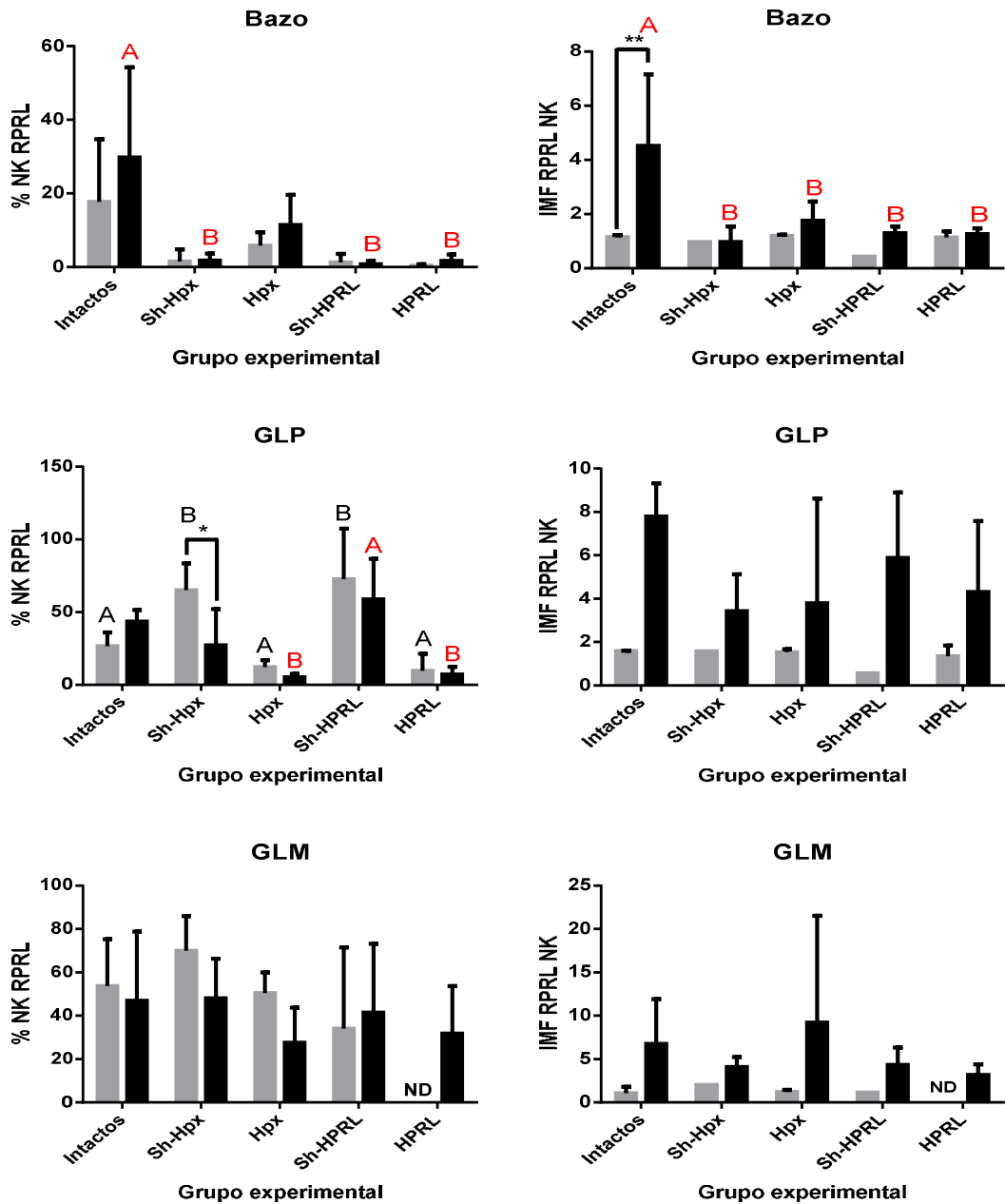


Figura 29. Porcentaje de células NK (CD161+) RPRL+ e IMF en bazo, GLP y GLM provenientes de ratas con y sin infección. Los datos representan la media \pm la desviación estándar. Los * muestran diferencias significativas (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) debidas al efecto de la infección y las letras (A, B, C) muestran las diferencias significativas ocasionadas por efecto de los tratamientos (cirugías). Sh-Hpx; ratas con cirugía simulada de hipofisectomía, Hpx; ratas hipofisectomizadas, Sh-HPRL; ratas con cirugía simulada de implante de adenohipófisis en la cápsula renal, HPRL; ratas con Implantes de adenohipófisis en cápsula

2.6 Porcentaje de linfocitos T $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta$ +) en Bazo, GLP y GLM

Los linfocitos T $\gamma\delta$ son células que cobran gran importancia en la inmunidad a nivel de mucosas. En las células provenientes de bazo se pueden observar cambios debidos al tratamiento en los grupos Sh-Hpx y Sh-HPRL sin infección. En estos mismos grupos, además del HPRL se puede ver que existe una disminución en las proporciones debida a la infección (Figura 30). En los GLP no hay diferencias significativas que se atribuyan al efecto del tratamiento o de la infección (Figura 30). En los GLM solo existe un aumento significativo debido a la infección en el grupo de animales Hpx (Figura 30).

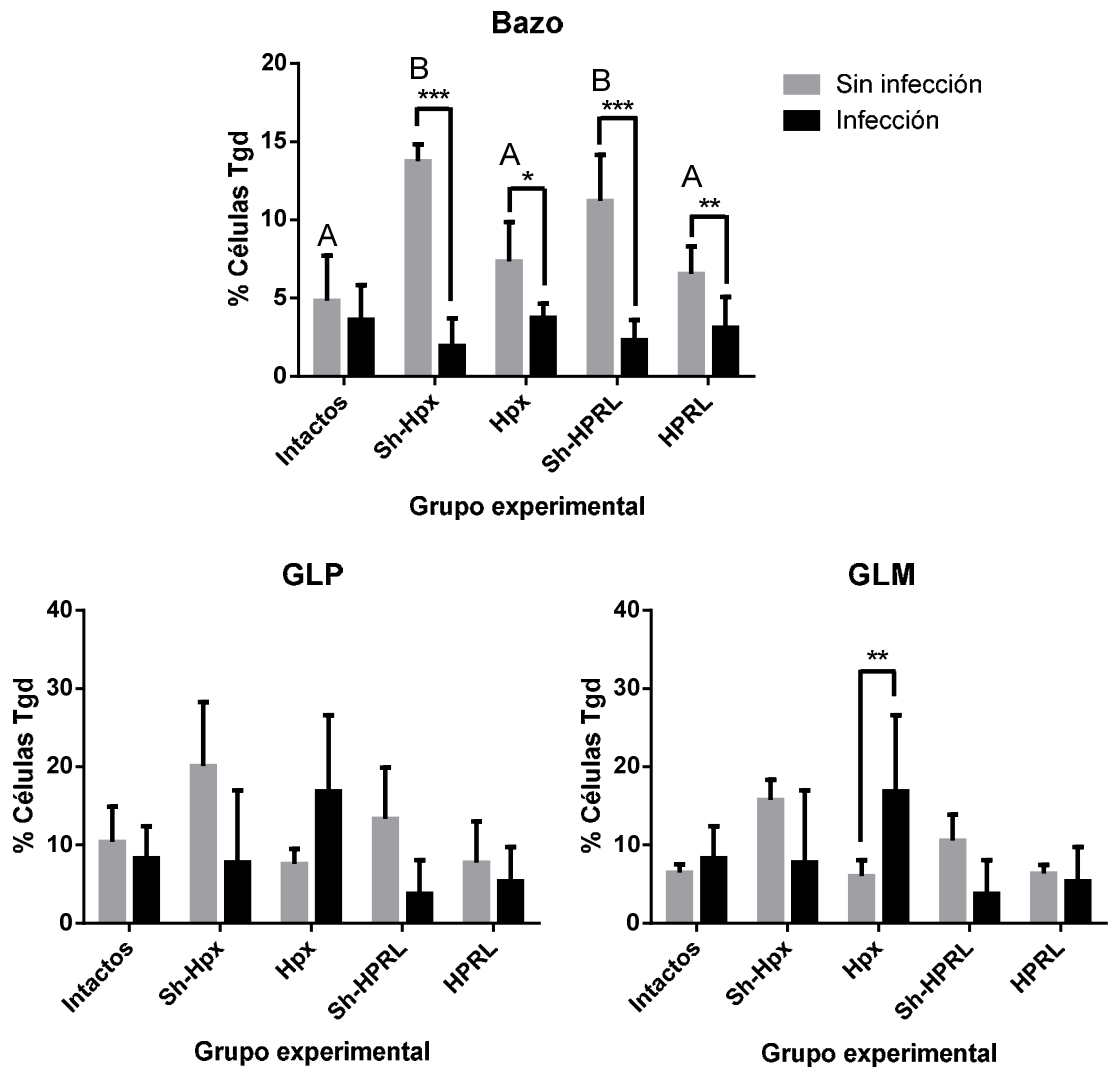


Figura 30. Porcentaje de células T $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta$ +) en bazo, GLP y GLM provenientes de ratas con y sin infección. Los datos representan la media \pm la desviación estándar. Los * muestran diferencias significativas (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) debidas al efecto de la infección y las letras (A, B, C) muestran las diferencias significativas ocasionadas por efecto de los tratamientos (cirugías). Sh-Hpx; ratas con cirugía simulada de hipofisectomía, Hpx; ratas hipofisectomizadas, Sh-HPRL; ratas con cirugía simulada de implante de adenohipófisis en la cápsula renal, HPRL; ratas con Implantes de adenohipófisis en cápsula renal.

2.6.1 Expresión del RPRL en linfocitos $T\gamma\delta$ ($TCR\gamma\delta^+$) obtenidos de Bazo, GLM y GLP

En el bazo se observaron diferencias significativas ($P < 0.001$) en los porcentajes de linfocitos $T\gamma\delta$ RPRL+ que son debidas a la infección en los grupos Sh-Hpx, Sh-HPRL y HPRL. En los animales infectados se observaron diferencias debidas al tratamiento en los grupos Sh-Hpx y HPRL, donde hubo un aumento en el porcentaje. En cuanto a la expresión relativa del receptor, no se observaron cambios significativos entre los distintos tratamientos y solo se presenta un aumento ($P < 0.001$) debido a la infección en el grupo HPRL (Figura 31).

Los GLP se presentaron una gran cantidad de cambios. Primeramente se pueden notar distintos efectos de la infección entre los tratamientos; En los grupos intactos e Hpx hubo disminuciones significativas, mientras que en los grupos Sh-Hpx, Sh-HPRL y HPRL las proporciones aumentaron. En los grupos sin infección se observa una disminución en los grupos Sh-Hpx, Sh-HPRL y HPRL. En los grupos infectados hay un aumento en los grupos Sh-Hpx, Sh-HPRL y HPRL. En cuanto a la expresión relativa del receptor, solo se observa un aumento ($P < 0.001$) en la expresión debido a la infección en el grupo Sh-HPRL (Figura 31).

Por otra parte, en los GLM se observan cambios debidos al tratamiento en los grupos con infección, donde hay un incremento ($P < 0.001$) en el porcentaje en los grupos Sh-Hpx, Sh-HPRL y HPRL. En estos mismos grupos se nota de igual manera el efecto de la infección. En la expresión relativa del receptor solo hay aumentos en la expresión debidos a la infección en los grupos Sh-Hpx, Hpx y Sh-HPRL (Figura 31).

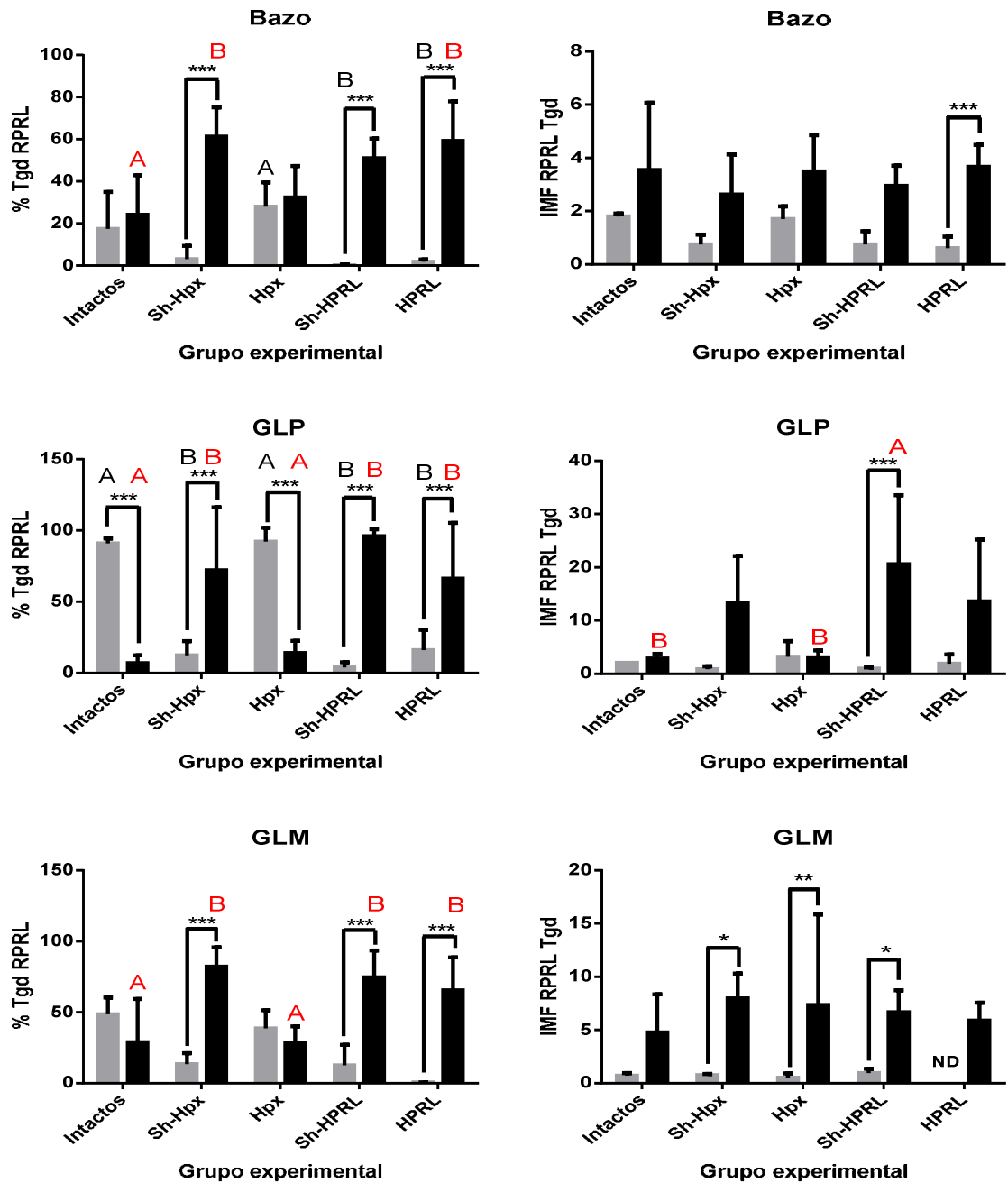


Figura 31. Porcentaje de linfocitos T $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta$) RPRL+ e IMF en bazo, GLP y GLM provenientes de ratas con y sin infección. Los datos representan la media \pm la desviación estándar. Los * muestran diferencias significativas (*P<0.05, **P<0.01, *P<0.001) debidas al efecto de la infección y las letras (A, B, C) muestran las diferencias significativas ocasionadas por efecto de los tratamientos (cirugías). Sh-Hpx; ratas con cirugía simulada de hipofisectomía, Hpx; ratas hipofisectomizadas, Sh-HPRL; ratas con cirugía simulada de implante de adenohipófisis en la cápsula renal, HPRL; ratas con Implantes de adenohipófisis en cápsula renal.**

3. Determinación de títulos de anticuerpos IgG específicos anti-*T. canis*

Con el objetivo de evaluar la respuesta inmune específica y el fenómeno de reactivación larvaria de *T. canis* se determinaron los títulos de anticuerpos contra el parásito.

La infección ocasiona un aumento en la producción de IgG específica. Los promedios de DO de las ratas de los grupos Sh-Hpx, Hpx, Sh-HPRL y HPRL fueron mayores ($P < 0.001$) que los promedios de DO de las ratas Hpx en donde la respuesta se vio abatida (Figura 32).

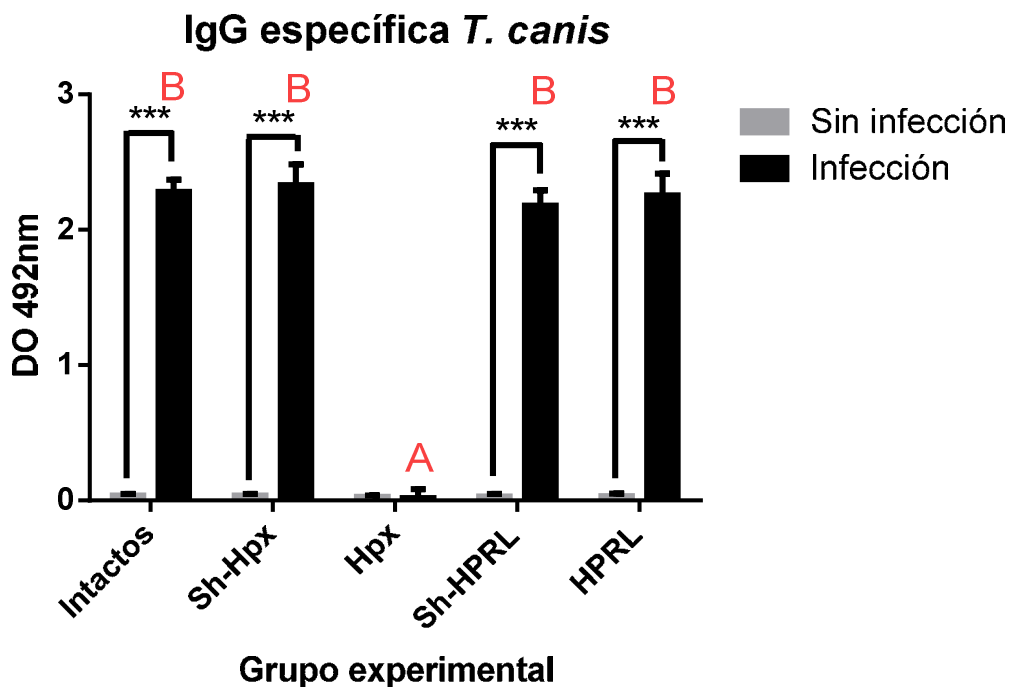


Figura 32. Títulos de anticuerpos específicos anti-*T. canis* en ratas macho control e infectadas. Los datos representan la media \pm la desviación estándar. $P < 0.001$. Sh-Hpx; ratas con cirugía simulada de hipofisectomía, Hpx; ratas hipofisectomizadas, Sh-HPRL; ratas con cirugía simulada de implante de adenohipófisis en la cápsula renal, HPRL; ratas con Implantes de adenohipófisis en cápsula renal.

4. Tinciones con Hematoxilina-Eosina

Para evaluar el efecto de la PRL sobre la reactivación de las larvas de *T. canis* se examinaron las diferencias histológicas en cuanto al infiltrado inflamatorio en pulmón, hígado y riñón entre los distintos grupos experimentales que fueron infectados.

4.1 Pulmón

Se observa la presencia de granulomas compuestos de una densa capa de colágeno y un núcleo que contiene células epitelioides, células gigantes multinucleadas y macrófagos, así como la presencia de larvas o restos de las mismas. Las larvas se encuentran a menudo dentro de un manto de eosinófilos. Fuera de la cápsula de colágeno de cada granuloma que contenía una larva había presencia de un infiltrado mixto, predominantemente linfocitario con un número moderado de eosinófilos y neutrófilos. Los granulomas sin larva también tenían una cápsula de colágeno rodeada de linfocitos y células plasmáticas, pero en el núcleo interno se encontraban restos de células necróticas en lugar de macrófagos, células epitelioides o eosinófilos. Las células gigantes multinucleadas se observan ocasionalmente en granulomas que no contienen larvas. No se observaron diferencias en los infiltrados inflamatorios entre los distintos grupos experimentales. Estos infiltrados corresponden a una inflamación crónica, en la cual no hay indicios de reactivación larvaria (Figura 33).

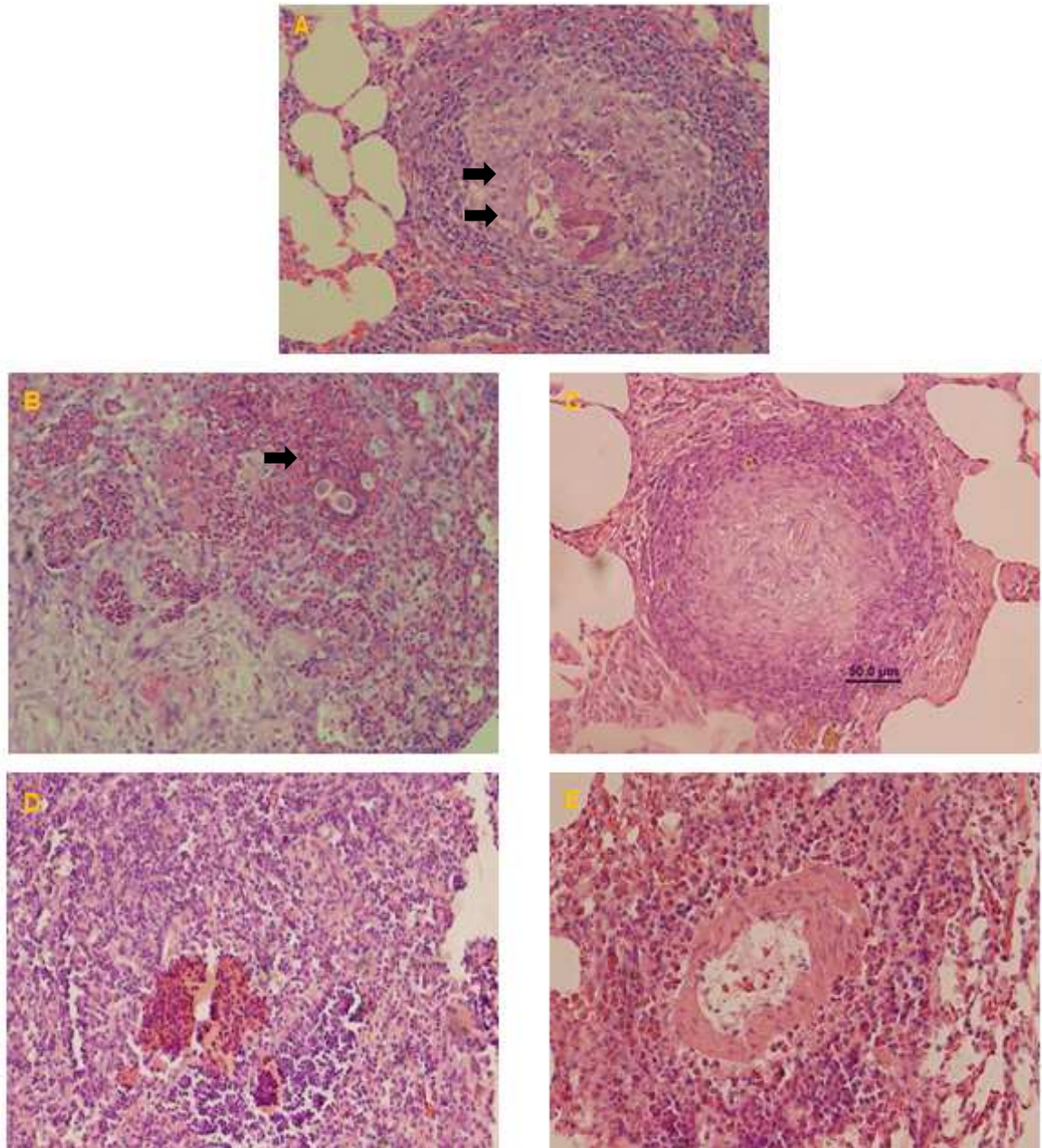


Figura 33. Vista histológica del pulmón en los distintos grupos de ratas infectadas. A. Intactos, B. Sh-Hpx, C. Hpx, D. Sh-HPRL, E. HPRL. 20x. Las flechas negras señalan la presencia de L2 de *T. canis*. Se observan los característicos granulomas eosinofílicos con presencia de abundante infiltrado inflamatorio. La zona exterior se compone principalmente de fibrocitos y colágeno. En la zona interior se observan eosinófilos y larvas.). Sh-Hpx; ratas con cirugía simulada de hipofisectomía, Hpx; ratas hipofisectomizadas, Sh-HPRL; ratas con cirugía simulada de implante de adenohipófisis en la cápsula renal, HPRL; ratas con Implantes de adenohipófisis en cápsula renal.

4.2 Hígado

Las lesiones más evidentes se observan en el grupo de ratas intactas, donde hubo presencia de lesiones granulomatosas. Estas lesiones presentan la misma organización que se describió previamente en el pulmón, pero, se presentaron en menor cantidad y magnitud. Hay presencia de macrófagos y eosinófilos con cierto grado de fibrosis (Figura 34). Las lesiones se encuentran en menor número debido a que es una infección crónica y el hígado es un órgano de paso durante la migración somática de las larvas en etapas tempranas de la infección.

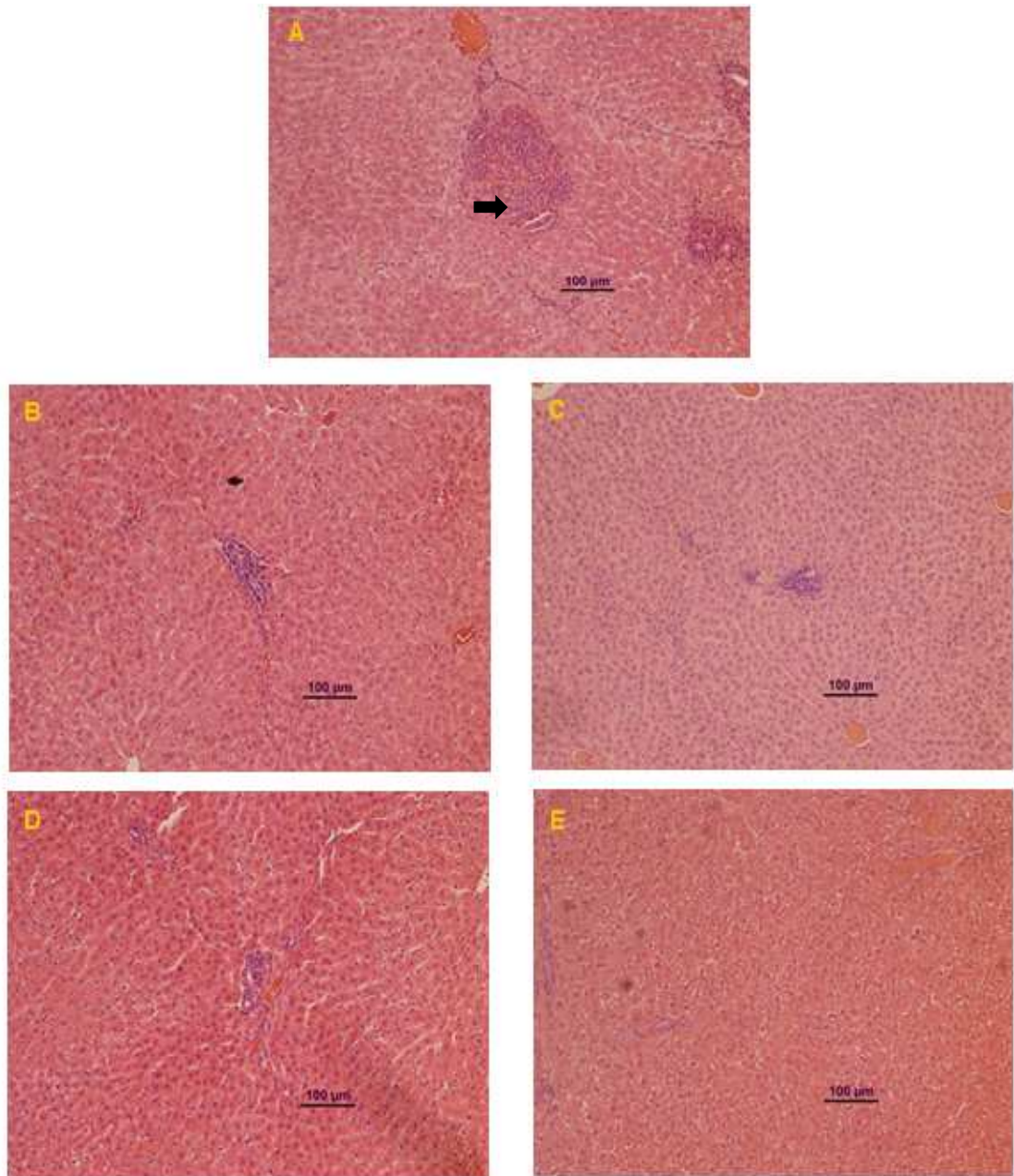


Figura 34. Vista histológica del hígado en los distintos grupos de ratas infectadas. A. Intactos, B. Sh-Hpx, C. Hpx, D. Sh-HPRL, E. HPRL. 20x. La flecha negra señalan la presencia de L2 de *T. canis*. Se observa la presencia de infiltrado inflamatorio y una larva en el grupo control. En los grupos restantes se observan pequeñas zonas de infiltrado inflamatorio sin presencia de larvas.). Sh-Hpx; ratas con cirugía simulada de hipofisectomía, Hpx; ratas hipofisectomizadas, Sh-HPRL; ratas con cirugía simulada de implante de adenohipófisis en la cápsula renal, HPRL; ratas con Implantes de adenohipófisis en cápsula renal.

4.3 Riñón

Los procesos inflamatorios se observaron únicamente en el grupo de ratas intactas a nivel de la zona de la corteza renal. Del mismo modo, se puede notar la presencia de granulomas eosinofílicos compuestos con una densa capa de colágeno y un núcleo que contiene células epitelioides. En los demás grupos experimentales se observa el tejido intacto (Figura 35).

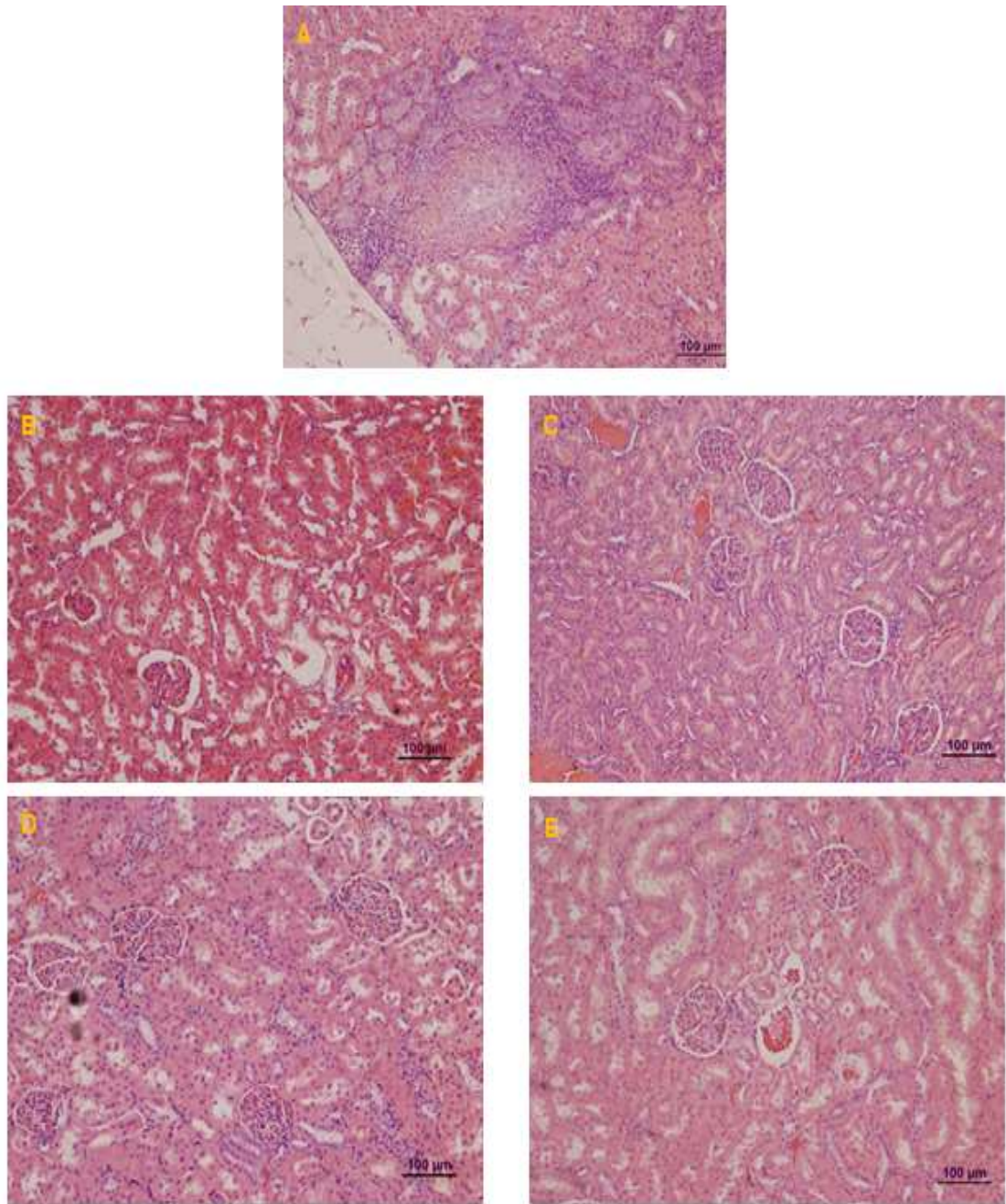


Figura 35. Vista histológica del riñón en los distintos grupos de ratas infectadas. A. Intactos, B. Sh-Hpx, C. Hpx, D. Sh-HPRL, E. HPRL. 20x. En el grupo control se observa un granuloma subcapsular sin presencia de larvas. En los demás grupos no se observan lesiones en la corteza renal y tampoco se encontró presencia de larvas.). Sh-Hpx; ratas con cirugía simulada de hipofisectomía, Hpx; ratas hipofisectomizadas, Sh-HPRL; ratas con cirugía simulada de implante de adenohipófisis en la cápsula renal, HPRL; ratas con Implantes de adenohipófisis en cápsula renal.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se evaluó el efecto de la PRL sobre la reactivación de las larvas somáticas de *T. canis* durante una infección crónica en un modelo murino en machos. Previamente, se ha sugerido que la PRL es la hormona responsable de reactivar a la larva tanto en hospederos definitivos como en paraténicos. Overgaauw y cols. (1998), realizaron una comparación entre hembras caninas gestantes y no gestantes infectadas con *T. canis* e hicieron una correlación entre los niveles de PRL en suero y los títulos de anticuerpos específicos contra el parásito. Ellos plantearon la hipótesis de que el aumento en la PRL a partir del día 40 de gestación, es el responsable de la reactivación de las larvas somáticas de este parásito. En el caso de los hospederos paraténicos, Jin y cols. (2008), realizaron un experimento en hembras BALB/c no gestantes con infección crónica, y a las cuales se les administró PRL exógena por 14 días. Ellos reportaron que al momento del sacrificio se lograron recuperar larvas de la glándula mamaria de estos animales, en comparación con los controles, a los cuales solo se les había administrado solución salina fisiológica (SSF).

Sin embargo, es importante resaltar, que esos estudios están hechos en hospederos hembras. Las desventajas de abordar este problema en hembras son: a) presentan variaciones hormonales (ciclos estrales), b) el desarrollo de la glándula mamaria es mayor en comparación con los machos y c) los niveles de esteroides sexuales femeninos y PRL son elevados. Por otra parte, las ventajas del uso de machos son: a) la ausencia de ciclos estrales, b) los bajos niveles de esteroides sexuales femeninos y PRL y c) la ausencia de desarrollo de la glándula mamaria en condiciones normales. Las diferencias en los niveles de esteroides sexuales se deben a los órganos donde se producen, pero esta producción no es estricta, ya que como se sabe, existen otros órganos donde se producen en menor medida los esteroides principales de cada sexo. Por ejemplo, la corteza suprarrenal, puede producir pequeñas cantidades de esteroides gonadales, al igual que el testículo lo hace con los estrógenos y el ovario con los andrógenos.

Así mismo, todas las glándulas esteroideogénicas son capaces de producir progesterona, aunque no la circulen como tal por tratarse de una molécula precursora de otras hormonas esteroideas. En el caso de la PRL, los estrógenos son importantes reguladores de su secreción, ya que los altos niveles de estos son estimulantes para los lactotopos hipofisarios, y son los responsables de los mayores niveles séricos de esta hormona en hembras que en machos. Los lactotopos hipofisarios expresan la forma α del receptor nuclear a estrógenos (Couse *et al.*, 1997). Krege y cols. (1998), estudiaron la expresión del receptor a estrógenos β en la glándula mamaria en desarrollo, y observaron, que los ratones mostraron un desarrollo de la glándula mamaria normal al igual que la lactancia, por lo tanto, ellos sugirieron que la forma β del receptor a estrógenos juega un papel muy pequeño o nulo en la regulación de la secreción de PRL. Los estrógenos están actuando directamente sobre los lactotopos de distintas formas: a) aumentando la expresión del gen para PRL (Maurer, 1982); y, aunque al parecer, los estrógenos no estimulan directamente la exosíntesis de la hormona, el aumento dramático en su síntesis conduce tanto a una mayor liberación espontánea, como a un mayor almacenamiento, que al momento de retirar el estímulo inhibitorio que ejerce la dopamina la hormona se libera. Además de lo anterior, los estrógenos también poseen acciones mitóticas directas sobre los lactotopos (Chun *et al.*, 1998; Spady *et al.*, 1999), lo cual genera que la población de los lactotopos sea mayor en hembras que en machos.

Nuestro abordaje para analizar la reactivación larvaria se realizó desde tres ángulos diferentes: a) mediante la evaluación de las cargas parasitarias en distintos órganos, particularmente en la glándula mamaria, b) determinando los niveles en los títulos de anticuerpos específicos contra el parásito y c) haciendo una observación de los procesos inflamatorios presentes durante la infección. Por otra parte, se analizó el papel de la PRL en distintas células del sistema inmunológico, donde se determinó el comportamiento de las mismas en condiciones normales y de infección, así como en condiciones de

hiperprolactinemia e hipoprolactinemia. Las ventajas de realizar el abordaje de este problema en machos y bajo nuestros términos se centran en el hecho de la eliminación de los niveles hormonales del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (eje H-H-G), del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (eje H-H-A) y del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (eje H-H-T), además de disminuir al mínimo los niveles de PRL, todo esto se logra mediante la hipofisectomía. Además de lo anterior, tenemos ratas macho con implantes de adenohipófisis en cápsula renal que producen exclusivamente PRL en exceso. Aunque no se logró un desarrollo pleno de la glándula mamaria en estos animales, la condición de hiperprolactinemia si generó cierto grado de crecimiento, y al ser un tejido que normalmente no estaba desarrollado al establecerse la infección, y que por acción de la PRL aumentó de tamaño, se podría estar generando la migración de las larvas a este tejido, sin embargo no se recuperaron larvas de la glándula mamaria de ninguno de los grupos experimentales.

En nuestros resultados, los porcentajes de recuperación larval en los pulmones a los 70 días post-infección son menores a lo reportado por Havasiová *et al.*, quien reporta un 10.23% de recuperación en cerebro a los 70 días post-infección en ratones C57BL6/J infectados con 1000 HL (Havasiová *et al.*, 1995). En otro experimento realizado en ratas Wistar infectadas con 500 HL y sacrificadas a los 60 días post-infección, se reporta aproximadamente un 1% de recuperación de larvas en pulmón y un 3.94% en cerebro (Lescano *et al.*, 2004). Otros datos obtenidos de jerbos infectados con 1000 HL y sacrificados a los 60 días post-infección arrojan un 4.5% de larvas recuperadas de cerebro, mientras que no se recuperaron larvas del tejido pulmonar (Alba *et al.*, 2009). Los datos anteriores demuestran que la migración de las L2 de *T. canis* puede variar dependiendo de factores como son la especie animal utilizada y el tiempo de infección además de lo mencionado anteriormente (tipo de hospedero, edad, sexo). Se puede decir que en general, el patrón de migración en los hospederos paraténicos es similar al ocurrido en el hospedero definitivo. Sin embargo, la

distribución de las larvas depende en gran medida de las especies infectadas ya que cada una parece tener sitios de migración predilectos.

La determinación de los títulos de anticuerpos IgG específicos es fundamental para evaluar la respuesta inmune humoral a los AgESTc. Cambios en los niveles de anticuerpos anti-*T. canis* durante una infección crónica, aunados a un aumento de hormonas como el que ocurre durante la gestación, pueden ser indicativos de una posible reactivación larvaria. Por este hecho, fue de nuestro interés evaluar estos niveles en condiciones normales, de hiperprolactinemia y de hipoprolactinemia. No se realizó un seguimiento de los niveles de anticuerpos en suero durante el transcurso de la infección y la única medición que se realizó fue al momento del sacrificio (70 días post-infección). En un experimento realizado en jerbos, se reporta que los anticuerpos reactivos contra los AgESTc en el suero se detectaron a partir de los 10 días post-infección, y estos niveles persistieron hasta los 130 días post-infección (Alba *et al.*, 2009). Este aumento y persistencia de la respuesta de anticuerpos es similar a la observada en los seres humanos con LMV (Fenoy *et al.*, 1992) y es debido al continuo estímulo antigénico durante la migración de las larvas y su localización en los distintos tejidos. En los resultados se observa que existe producción de anticuerpos específicos en todos los grupos infectados, menos en los animales hipofisectomizados. Esta inhibición en la producción de anticuerpos podría estar indicando que la respuesta inmune contra *T. canis* es dependiente de hormonas hipofisarias, sin que hasta el momento existan reportes en la literatura de que una respuesta inmune específica hacia cualquier agente infeccioso (virus, bacteria, parásito, etc.) esté regulada por algún estímulo hormonal. A diferencia de lo esperado, que era observar mayores niveles de anticuerpos en los animales hiperprolactinémicos, no se encontraron diferencias entre los demás grupos experimentales. Esta ausencia en las diferencias probablemente sea debida a que el tiempo de infección fue “muy corto” y no se permitió que los niveles de anticuerpos bajaran lo suficiente como para observar diferencias.

Como ya se mencionó anteriormente, la PRL tiene distintos efectos que están relacionados con diversas áreas como la reproducción, el desarrollo y crecimiento, el equilibrio de líquidos y electrolitos y la modulación del sistema inmunológico. En este sistema, la PRL ejerce efectos parácrinos y autócrinos y ha sido relacionada con algunos procesos de autoinmunidad. Actualmente la PRL es considerada no sólo como una hormona, sino también como una citocina. También se ha demostrado que los linfocitos son sitios de síntesis de PRL. En los primeros estudios, se indicó que la adición de un anticuerpo anti-PRL inhibía la proliferación de LT y LB de rata que había sido inducida por factores mitogénicos (Hartmann *et al.*, 1989). Posteriormente, y debido a que este efecto se encontró en ausencia de suero en el medio de cultivo y que además de ser revertido por la adición de PRL exógena, se sugirió que una molécula parecida a la PRL era producida por los linfocitos y afectaba la progresión de su ciclo celular. Montgomery y cols. (1987) también observaron la presencia de una molécula en el medio de cultivo de esplenocitos murinos que inducía actividad biológica en a línea celular Nb2 que es dependiente de PRL para su proliferación y cuyo efecto fue revertido en presencia de un anticuerpo anti-PRL. Lo anterior, nos deja de manifiesto que una de las funciones más relevantes de la PRL a nivel del sistema inmunológico es la de ser un factor de supervivencia, ya que participa en la regulación de la densidad de población celular controlando tanto la proliferación como la muerte.

En la literatura no existe una descripción detallada de como la PRL puede estar afectando las subpoblaciones celulares del sistema inmunológico en condiciones de una hipoprolactinemia causada por hipofisectomía o una hiperprolactinemia causada por trasplantes de adenohipófisis. Tampoco existen datos de cuando aunado a estas condiciones se agrega otro factor adicional como puede ser un reto antigénico (como en este caso el parásito *T. canis*), sin embargo, en algunos experimentos se ha observado que ratas hipofisectomizadas con bajos niveles de PRL circulante mostraron un aumento en los niveles de PRL

circulante 2-3 semanas después de la cirugía, lo cual permitió a estos animales sobrevivir (Nagy y Berczi, 1991). Esto nos indica que, cuando la fuente principal de PRL (la hipófisis) fue eliminada, una forma de PRL extrahipofisiaria se produjo y esta puede ser "exportada" a la circulación general con el fin de cumplir con las importantes funciones biológicas de esta hormona en otros órganos, incluido el sistema inmunológico. En otros experimentos se vio que las ratas hipofisectomizadas muestran anemia, leucopenia, trombocitopenia y un déficit inmunológico del cual se recuperaron después de la administración de PRL exógena o de la colocación de un trasplante de hipófisis (Nagy *et al.*, 1983). Por lo tanto, se sugiere que la inmunopoyesis puede estar influenciada ya sea por la PRL de origen hipofisiario o extrahipofisiario.

Los hallazgos de este trabajo en cuanto a la participación de la PRL en los porcentajes de las subpoblaciones celulares difiere dependiendo del tipo de cirugía a la que se sometieron, del órgano en el que se están observando (bazo, GLP, GLM) y de la infección. En el caso de los LT totales (CD3+) se puede observar una disminución en el porcentaje de estas células en el bazo de los animales HPRL sin infección, y dicha disminución se ve compensada al momento de que se realiza la infección. En los GLM hay un aumento en los animales hipofisectomizados sin infección, lo cual podría indicar que el aumento en la proporción de estas células es independiente de las hormonas hipofisiarias o que el tejido linfoide asociado al intestino responde de manera diferencial. Por otra parte, en los LT cooperadores (CD4+) se observa un aumento en esta subpoblación tanto en el bazo, como en los GLP y en los GLM debido a la infección. Esto concuerda con el aumento reportado no solo en infecciones ocasionadas por este parásito, sino también con lo que se ha documentado en muchos otros parásitos (Sher, 1995; Finkelman *et al.*, 2004; Vally *et al.*, 2010; Allen *et al.*, 2012). En los LT citotóxicos (CD8+) se observan diferencias debidas a la infección tanto en bazo, como en GLM y GLP. El aumento en esta subpoblación durante la infección crónica concordaría con la polarización de la respuesta

inmunológica hacia Th1 que se da durante esta etapa en modelos murinos para producir IFN- γ (Pecinali et al., 2005) y con ello colaborar con la formación del granuloma eosinofílico. Los LB (CD45+) son muy importantes en la respuesta inmune contra *T. canis* ya que son los responsables de producir los anticuerpos específicos contra el parásito. Aunque no existen reportes en la literatura acerca de la cantidad de LB durante la infección, existen datos que muestran que hay un incremento en los niveles de anticuerpos como IgM, IgG (Matsumura, 1983) e IgE (Kayes, 2006). Nuestros resultados muestran que, efectivamente, la infección causa un aumento en el porcentaje de LB en el bazo, en los GLM y GLP en los grupos intactos, Hpx y HPRL, lo cual nos indica que el número de LB no está influenciado por el efecto del nivel de PRL u otras hormonas hipofisarias. Respecto a las células NK, se ha reportado que estas responden a la estimulación por PRL de un modo dosis-dependiente: Las concentraciones de PRL correspondientes a un valor normal plasmático inducen el desarrollo de citotoxicidad (Cesano *et al.*, 1994), mientras que concentraciones 10 veces mayores ejercen una clara actividad inhibitoria sobre el desarrollo, la actividad y la proliferación tras su activación por IL-2 (Matera *et al.*, 1992). En este aspecto, nuestros resultados muestran que el porcentaje de células NK fue independiente de la concentración plasmática de PRL, pero si se encontraron aumentos en estos porcentajes debido a la infección en algunos grupos experimentales.

La presencia del RPRL en las células del sistema inmunológico ha sido reportada en varios estudios. Russell y cols. (1985), demostraron la expresión del RPRL en LT y LB obtenidos de esplenocitos humanos. Además, por inmunofluorescencia, se observó que el RPRL se expresa en células NK CD56+ uterinas *in situ*, y mediante RT-PCR y *Western blot* se demostró su expresión en células NK CD56+ deciduales (Gubbay *et al.*, 2002). Nuestros resultados demuestran que efectivamente los LT, LB y las células NK son células donde se expresa el RPRL, y que además esta expresión aumenta cuando las

concentraciones de PRL son muy bajas y también durante la infección crónica con *T. canis*.

En cuanto a los procesos inflamatorios, nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Pearson y cols. quienes reportaron el mismo tipo de lesiones hepáticas durante la toxocariosis crónica (8 meses de infección) en ratones BALB/c (Pearson *et al.*, 1986). Martínez, en un experimento realizado con jerbos, reportó lesiones similares en los tres órganos a los 60 días de infección (Martínez, 2004). En los grupos con cirugía, no se encontraron lesiones en los riñones e hígado, esto puede ser debido a que hizo falta realizar más cortes hasta llegar a los procesos inflamatorios o a que las larvas ya no se encuentren en esos órganos y se localicen en el tejido muscular, que es el tejido donde se localizan en mayor número durante la infección crónica. En ninguno de los grupos experimentales se observaron procesos inflamatorios agudos que pudieran estar sugiriendo el movimiento de las larvas hacia otros tejidos como son el útero y la glándula mamaria.

Durante la toxocariosis no existen evidencias claras de que la PRL u otras hormonas sean fundamentales para el desarrollo de la infección como se ha reportado en otros parásitos. Como ya se hizo mención, la PRL se ha estudiado ampliamente en las infecciones causadas por protozoarios, donde se ha visto que tiene la capacidad de montar una respuesta tipo Th1 capaz de proteger contra las mismas, como es el caso de la toxoplasmosis (Benedetto *et al.*, 2001; Dzitko *et al.*, 2008), la leishmaniasis (Gómez *et al.*, 2003) y la malaria (Bayuomi *et al.*, 2009) entre otras. En el caso de los esteroides sexuales, se ha demostrado que pueden tener distintos efectos sobre el advenimiento de distintas enfermedades parasitarias. Como ya se mencionó, en los experimentos realizados por Morales-Montor y cols. (1996) se ha demostrado que el 17 β -estradiol favorece el crecimiento y la reproducción del parásito *T. crassiceps*. Esto genera la existencia de una mayor carga parasitaria en las hembras, haciendo de esta parasitosis una enfermedad asociada al sexo. Por otra parte, los efectos que ejercen los

esteroides sexuales en el sistema inmunológico se ven evidenciados durante la gestación, generando un impacto sobre la susceptibilidad o resistencia a las infecciones parasitarias en las hembras gestantes (Krishnan *et al.*, 1996). Aunado a estos cambios en los niveles de esteroides sexuales durante la gestación, no podemos dejar de fuera a la PRL ya que también es una hormona muy importante durante esta etapa.

El efecto de la PRL y los esteroides sexuales no solo podría ser sobre el sistema inmunológico, sino también sobre el parásito. En este sentido, se ha sugerido que existe un mecanismo de explotación del hospedero por el parásito, en donde éste último aprovecha directamente hormonas y factores de crecimiento del hospedero que le permiten un rápido establecimiento y mayor efectividad en su reproducción, culminando así con una infección progresivamente más exitosa. Estos fenómenos de trans-regulación han sido poco explorados en parásitos. Sin embargo, existen evidencias que apoyan la noción de que una regulación de hospedero a parásito o transregulación es posible, tanto que a la fecha se ha descrito en ocho especies parasitarias distintas y con diversas hormonas de naturaleza esteroide y proteica. Se sabe que el tratamiento *in vitro* con cortisol de merozoitos del parásito *Plasmodium falciparum* aumenta el número y el tamaño de los gametocitos (Maswoswe *et al.*, 1985). De igual forma, los merozoitos tratados con insulina, estradiol, progesterona y testosterona incrementaron considerablemente el número de gametocitos producidos *in vitro*, aumentando también, al igual que el cortisol, el crecimiento y reproducción del parásito en este estadio. Caso opuesto sucede cuando estos parásitos son tratados con 16 α -bromoepiandrosterona, análogo de la dehidroepiandrosterona (DHEA), donde se observa una disminución en el crecimiento de hasta un 25% (Freilich *et al.*, 2000). Por otra parte, y como ya se mencionó, el tratamiento con DHEA de cercarías, esquistosomas y parásitos adultos de *Schistosoma mansoni* inhibe la viabilidad y ovoposición (Morales-Montor *et al.*, 2001), mientras que, los amastigotes de *Trypanosoma cruzi* tratados con EGF, incrementan su proliferación (Ghansah *et*

al., 2002). Tomando en cuenta la información que aportan estos ejemplos, resulta importante resaltar el potente efecto trans-regulador que las hormonas del hospedero tienen sobre el parásito. En el caso de *T. canis* hasta la fecha no existen reportes de como las hormonas pueden estar afectando o favoreciendo el crecimiento y desarrollo del parásito en cualquiera de sus estadios. Por lo tanto, resulta de gran importancia realizar este tipo de estudios ya que la PRL y otras hormonas esteroideas que se encuentran elevadas durante la gestación (estradiol, progesterona) podrían estar actuando en combinación directamente sobre la larva durante el fenómeno de reactivación, así como también en el crecimiento, desarrollo y establecimiento del parásito en un hospedero inmunocompetente.

CONCLUSIÓN

Nuestros resultados muestran que la PRL por sí sola no fue capaz de reactivar las larvas de *T. canis*. Esto sugiere que esta reactivación, no está dada por la acción de una sola hormona, si no que todo el microambiente hormonal que existe durante la gestación favorece la misma, ya sea mediante la modulación de la respuesta inmune del hospedero o a través de otro tipo de mecanismos como puede ser la existencia de “receptores hormonales” en los parásitos, los cuales estimulen su motilidad hacia los sitios específicos de transmisión, y de tal forma continuar con su ciclo y asegurar su supervivencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agro A., Stanisz A.M.: Neuroimmunomodulation: classical and non-classical cellular activation. *Adv. Neuroimmunol.* 1995, 5 (3): 311-319.
2. Akmaev I.G.: Current concepts of the interactions of regulating systems: nervous, endocrine and immune. *Usp. Fiziol. Nauk.* 1996, 27 (1): 3-20.
3. Alba-Hurtado F.: Ascariosis. En Ibarra V.F., Figueroa C. J.A., Quiroz R.H.: *Parasitología Veterinaria Vol. II. Helmintos.* México, D.F. 2011: 81-87.
4. Alba-Hurtado F., Flores-Alatorre L, Cuéllar OJ, Martínez LJP, editors.: *Desarrollo de un nuevo modelo de toxocariasis ocular. Memorias del XXV Congreso Nacional de Microbiología.* Ciudad Obregón, Son. México. 1994.
5. Alba-Hurtado F., Muñoz-Guzmán M.A.: Immune responses associated with resistance to haemonchosis in sheep. *Biomed. Res. Int.* 2013: 11 páginas.
6. Alba-Hurtado F., Muñoz-Guzmán M.A., Valdivia-Anda G., Tórtora J.L., Ortega-Pierres M.G.: *Toxocara canis*: larval migration dynamics, detection of antibody reactivity to larval excretory-secretory antigens and clinical findings during experimental infection of gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Exp. Parasitol.* 2009, 122 (1): 1-5.
7. Allen J.E., Maizels R.M.: Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nat. Rev. Immunol.* 2011, 11 (6): 375-388.
8. Anteson R.K., Corkish J.D.: An investigation of helminth parasites in well-cared for dogs in Accra. *Ghana Med. J.* 1975, 14 (3): 193-195.
9. Arai T., Abe K., Matsuoka H., Yoshida M., Mori M., Goya S., Kida H., Nishino K., Osaki T., Tachibana I., Kaneda Y., Hayashi S.: Introduction of the interleukin-10 gene into mice inhibited bleomycin-induced lung injury in vivo. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2000, 278 (5): 914-922.
10. Bardón I.M.: *Contribución a la biología e inmunología de Toxocara canis.* Memoria. Universidad Complutense. Facultad de Farmacia. Departamento de Parasitología. Madrid, España. 1992.

11. Barutzki D., Schaper R.: Endoparasites in Dogs and Cats in Germany 1999 – 2002. *Parasitol. Res.* 2003, 90: 148-150.
12. Bass J.L., Mehta K.A., Glickman L.T., Eppes B.M.: Clinically inapparent *Toxocara* infection in children. *N. Engl. J. Med.* 1983, 308: 723-724.
13. Bayoumi N.K., Elhassan E.M., Elbashir M.I., Adam I.: Cortisol, prolactin, cytokines and the susceptibility of pregnant Sudanese women to *Plasmodium falciparum* malaria. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 2009, 103 (2): 111-117.
14. Bazan J.F.: A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989, 164 (2): 788-795.
15. Beaver P.C., Snyder H., Carrera M., Dent H., Lafferty W.: Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans. *Pediatrics.* 1952, 9: 7-19.
16. Becker A.C., Rohen M., Epe C., Schnieder T.: Prevalence of endoparasites in stray and fostered dogs and cats in Northern Germany. *Parasitol. Res.* 2012, 111 (2): 849-857.
17. Benedetto N., Folgore A., Romano Carratelli C., Galdiero F.: Effects of cytokines and prolactin on the replication of *Toxoplasma gondii* in murine microglia. *Eur. Cytokine Netw.* 2001, 12 (2): 348-358.
18. Ben-Jonathan N., Hnasko R.: Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr. Rev.* 2001, 22 (6): 724-763.
19. Besedovsky H.O., Del Rey A.: Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr. Revs.* 1996, 17: 64-102.
20. Boutin J.M., Jolicoeur C., Okamura H., Gagnon J., Ederly M., Shirota M., Banville D., Dusanter-Fourt I., Djiane J., Kelly P.A.: Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. *Cell.* 1988, 53 (1): 69-77.
21. Buijs J., Borsboom G., Renting M., Hilgersom W.J., van Wieringen J.C., Jansen G., Neijens J.: Relationship between allergic manifestations and

- Toxocara* seropositivity: a cross-sectional study among elementary school children. Eur. Respir. J. 1997, 10: 1467-1475.
22. Buijs J., Egbers M.W., Lokhorst W.H., Savelkoul H.F., Nijkamp F.P.: *Toxocara*-induced eosinophilic inflammation. Airway function and effect of anti-IL-5. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1995, 151: 873-878.
23. Buijs J., Lokhorst W.H., Robinson J., Nijkamp F.P.: *Toxocara canis*-induced murine pulmonary inflammation: analysis of cells and proteins in lung tissue and bronchoalveolar lavage fluid. Parasite Immunol. 1994, 16 (1): 1-9.
24. Bradford M.M.: A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 1976, 72: 248-254.
25. Brunaska M., Dubinsky P., Reiterova K.: *Toxocara canis*: ultrastructural aspects of larval moulting in the maturing eggs. Int. J. Parasitol. 1995, 25: 683-690.
26. Bwalya E.C., Nalubamba K.S., Hankanga C., Namangala B.: Prevalence of canine gastrointestinal helminths in urban Lusaka and rural Katete Districts of Zambia. Prev. Vet. Med. 2011, 100 (3-4): 252-255.
27. Campos R.R., Quintanar S.A., Jarillo L.R., Oliver A.G., Ventura J.J., Rivera A.V., Berczi I., Kovacs K.: Hypophysectomy and neurointermediate pituitary lobectomy reduce serum immunoglobulin M (IgM) and IgG and intestinal IgA responses to *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection in rats. Infect. Immun. 2006, 74(3):1883-1889.
28. Cantó G.J., García M.P., García A., Guerrero M.J., Mosqueda J.: The prevalence and abundance of helminth parasites in stray dogs from the city of Queretaro in central Mexico. J. Helminthol. 2011, 85 (3): 263-269.
29. Cesano A., Oberholtzer E., Contarini M., Geuna M., Bellone G., Matera L.: Independent and synergistic effect of interleukin-2 and prolactin on development of T- and NK-derived LAK effectors. Immunopharmacology 1994, 28 (1):67-75.

30. Chan P.W., Anuar A.K., Fong M.Y., Debruyne J.A., Ibrahim J.: *Toxocara* seroprevalence and childhood asthma among Malaysian children. *Pediatr. Int.* 2001, 43 (4): 350-353.
31. Chieffi P.P., Müller E.E.: Prevalence of parasitic diseases by *Toxocara canis* in dogs, and the finding of eggs of *Toxocara* species in the soil of public places in the urban area of Londrina, State of Parana, Brazil. *Rev. Salude Publica* 1976, 10 (4): 367-372.
32. Chiodi H.: The relationship between the thymus and the sexual organs. *Endocrinology* 1940, 26: 107-116.
33. Chun T.Y., Gregg D., Sarkar D.K., Gorski J.: Differential regulation by estrogens of growth and prolactin synthesis in pituitary cells suggests that only a small pool of estrogen receptors is required for growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1998, 95 (5): 2325-2330.
34. Clevenger C.V., Russell D.H., Appasamy P.M., Prystowsky M.B.: Regulation of interleukin 2-driven T-lymphocyte proliferation by prolactin. *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* 1990, 87 (16): 6460-6464.
35. Cooper P.J.: *Toxocara canis* infection: an important and neglected environmental risk factor for asthma? *Clin. Exp. Allergy.* 2008, 38 (4): 551-553.
36. Corbacho A.M., Macotela Y., Nava G., Torner L., Dueñas Z., Noris G., Morales M.A., Martínez De La Escalera G., Clapp C.: Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms. *J. Endocrinol.* 2000, 166 (1): 53-62.
37. Cordero del C.M., Rojo F., Martínez A., Sánchez C., Hernández S., Navarrete I., Diez P., Quiroz R.H., Carballo M.: *Parasitología Veterinaria*. Mc Graw Hill Interamericana. España. 1999.
38. Cosman D., Lyman S.D., Idzerda R.L., Beckmann M.P., Park L.S., Goodwin R.G., March C.J.: A new cytokine receptor superfamily. *Trends. Biochem. Sci.* 1990, 15 (7): 265-270.

39. Couse J.F., Lindzey J., Grandien K., Gustafsson J.A., Korach K.S.: Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology*. 1997, 138 (11): 4613-4621.
40. Damian R.T.: Parasite immune evasion and exploitation: reflections and projections. *Parasitology*. 1997, 115 suppl: S169-S175.
41. Despommier D.: Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clin. Microbiol. Rev.* 2003, 16(2): 265-272.
42. Dodge J.S.: *Toxocara canis*: The risks of infection. *N.Z. Med. J.* 1980, 91 (651): 24-26.
43. De Leon-Nava M.A., Morales-Montor J.: Dimorfismo sexual inmunitario: ¿pueden los esteroides sexuales polarizar el perfil de citocinas Th1/Th2? *Rev. Invest. Clin.* 2006, 58: 161-169.
44. Dogusan Z., Hooghe R., Verdood P., Hooghe-Peters E.L.: Cytokine-like effects of prolactin in human mononuclear and polymorphonuclear leukocytes. *J. Neuroimmunol.* 2001, 120 (1-2): 58-66.
45. Dzitko K., Malicki S., Komorowski J.: Effect of hyperprolactinemia on *Toxoplasma gondii* prevalence in humans. *Parasitol. Res.* 2008, 102 (4): 723-729.
46. Eguía-Aguilar P., Cruz-Reyes A., Martínez-Maya J.J.: Ecological analysis and description of the intestinal helminths present in dogs in Mexico City. *Vet. Parasitol.* 2005, 127 (2): 139-146.
47. Elenkov I.J.: Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2004, 1024: 138-146.
48. Epe C., Ising-Volmer S., Stoye M.: Parasitological fecal studies of equids, dogs, cats and hedgehogs during the years 1984-1991. *Dtsch Tiererztl Wochenschr.* 1993, 100 (11): 426-428.

49. Fashuyi S.A.: Diagnosis of gastro-intestinal helminths of dogs in Lagos area using the Kato-Katz technique. *Bull. Anim. Health Prod. Afr.* 1981, 29 (4): 333-335.
50. Fattah D.I., Maizels R.M., McLaren D.J., Spry C.J.: *Toxocara canis*: interaction of human blood eosinophils with the infective larvae. *Exp. Parasitol.* 1986, 61 (3): 421-431.
51. Fenoy S., Cuéllar C., Aguila C., Guillén J.L.: Persistence of immune response in human toxocariasis as measured by ELISA. *Int. J. Parasitol.* 1992, 22 (7):1037-1038.
52. Finkelman F.D., Shea-Donohue T., Morris S.C., Gildea L., Strait R., Madden K.B., Schopf L., Urban J.F. Jr.: Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunol. Rev.* 2004, 201: 139-155.
53. Freeman M.E., Kanyicska B., Lerant A., Nagy G.: Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol. Rev.* 2000, 80 (4): 1523-1631.
54. Freilich D., Ferris S., Wallace M., Leach L., Kallen A., Frincke J., Ahlem C., Hacker M., Nelson D., Hebert J.: 16-alpha-bromoepiandrosterone, a dehydroepiandrosterone (DHEA) analogue, inhibits *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* growth. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2000, 63 (5-6): 280-283.
55. Gellersen B., DiMattia G.E., Friesen H.G., Bohnet H.G.: Regulation of prolactin secretion in the human B-lymphoblastoid cell line IM-9-P3 by dexamethasone but not other regulators of pituitary prolactin secretion. *Endocrinology.* 1989, 125 (6): 2853-2861.
56. Ghadirian E., Viens P., Strykowski H., Dubreuil F.: Epidemiology of Toxocariasis in the Montreal area. Prevalence of *Toxocara* and other helminth ova in dogs and soil. *Can. J. Public Health.* 1976, 67 (6): 495-498.
57. Ghansah T.J., Ager E.C., Freeman-Junior P., Villalta F., Lima M.F.: Epidermal growth factor binds to a receptor on *Trypanosoma cruzi*

- amastigotes inducing signal transduction events and cell proliferation. J. Eukaryot. Microbiol. 2002, 49 (5): 383-390.
58. Gingrich E.N., Scorza A.V., Clifford E.L., Olea-Popelka F.J., Lappin MR.: Intestinal parasites of dogs on the Galapagos Islands. Vet. Parasitol. 2010, 169 (3-4): 404-407.
59. Glickman L.T., Schantz P.M.: Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. Epidemiol. Rev. 1981, 3: 230-250.
60. Glickman L.T., Magnaval F., Domansky L., Shofer F., Lauria S., Gottstein b., Brochier B.: Visceral larva migrans in French adults: a new disease syndrome?. Am.J. Epidemiol. 1987, 125: 1019-1034.
61. Goffette S., Jeanjean A.P., Duprez T.P.J., Bigaignon G., Síndic C.J.M.: Eosinophilic pleocytosis and myelitis related to *Toxocara canis* infection. Europ. J. Neurol. 2000, 7: 703-706.
62. Gomez-Ochoa P., Gascon F.M., Lucientes J., Larraga V., Castillo J.A.: Lactating females Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) show protection against experimental *Leishmania infantum* infection. Vet. Parasitol. 2003, 116 (1): 61-64.
63. Gubbay O., Critchley H.O., Bowen J.M., King A., Jabbour H.N.: Prolactin induces ERK phosphorylation in epithelial and CD56(+) natural killer cells of the human endometrium. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2002, 87 (5): 2329-2335.
64. Gudelsky G.A., Porter J.C.: Release of dopamine from tuberoinfundibular neurons into pituitary stalk blood after prolactin or haloperidol administration. Endocrinology. 1980, 106 (2): 526-529.
65. Habluetzel A., Traldi G., Ruggieri S., Attili A.R., Scuppa P., Marchetti R., Menghini G., Esposito F.: An estimation of *Toxocara canis* prevalence in dogs, environmental egg contamination and risk of human infection in the Marche region of Italy. Vet. Parasitol. 2003, 13 (3-4): 243-252.

66. Hamidou M.A., Fradet G., Kadi A.M., Robin A., Moreau A., Magnaval J.F.: Systemic vasculitis with lymphocytic temporal arteritis and *Toxocara canis* infection. Arch. Intern. Med. 2002, 162(13): 1521-1524.
67. Hamilton C.M., Stafford P., Pinelli E., Holland C.V.: A murine model for cerebral toxocariasis: characterization of host susceptibility and behaviour. Parasitology. 2006, 132(6): 791-801.
68. Haralabidis S.T., Papazachariadou M.G., Koutinas A.F., Rallis T.S.: A survey on the prevalence of gastrointestinal parasites of dogs in the area of Thessaloniki, Greece. J. Helminthol. 1988, 62 (1): 45-49.
69. Hartmann D.P., Holaday J.W., Bernton E.W.: Inhibition of lymphocyte proliferation by antibodies to prolactin. FASEB J. 1989, 3 (10): 2194-2202.
70. Hassan I.C.: A five-year analysis of diseases of dogs and cats in the Veterinary Clinic of Freetown, Sierra Leone. Beitr. Trop. Landwirtsch Veterinarmed. 1984, 22 (3): 305-308.
71. Havasiová R.K., Tomasovicová O., Dubinský 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(1):13-17.
72. Hessel E.M., Van Oosterhout A.J., Hofstra C.L., De Bie J.J., Garssen J., Van Loveren H., Verheyen A.K., Savelkoul H.F., Nijkamp F.P.: Bronchoconstriction and airway hyperresponsiveness after ovalbumin inhalation in sensitized mice. Eur. J. Pharmacol. 1995, 293 (4): 401-412.
73. Hinz E.: Intestinal helminths in Bangkok stray dogs and their role in public health. Zentralbl Bakteriell. Mikrobiol. Hyg. B. 1980, 171 (1): 79-85.
74. Hinz E., Blatz I.: Intestinal helminths of domestic dogs in the Hessian Neckar Valley, Federal Republic of Germany. Int. J. Zoonoses. 1985, 12 (3): 211-213.
75. Holland C., O'Connor O., Taylor M.R., Hughes G, Girwood R.H., Smith H.: Families, park, gardens and toxocariasis. Scand J. Infect dist. 1991, 23: 225-231.

76. Holt P.G., Macaubas C., Stumbles P.A., Sly P.D.: The role of allergy in the development of asthma. *Nature*. 1999, 402: B12-B17.
77. Huapaya P., Espinoza Y., Roldán W., Jiménez S.: Toxocariosis humana: ¿problema de salud pública? *An. Fac. Med. (Lima)*. 2009, 70(4): 283-290.
78. Humbert P., Niezborala M., Salembier R.: Skin manifestations associated with toxocariasis: a case-control study. *Dermatology*. 2000, 210: 230-234.
79. Jin Z., Akaon N., Ohta N.: Prolactin evokes lactational transmission of larvae in mice infected with *Toxocara canis*. *Parasitol. Int.* 2008, 57: 495-498.
80. Johnston J., Gasser R.B.: Copro-parasitological survey of dogs in southern Victoria. *Australian Veterinary Practitioner*. 1993, 23:127-131.
81. Jordan H.E., Mullins S.T., Stebbins M.E.: Endoparasitism in dogs: 21, 583 cases (1981-1990). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1993, 203 (4): 547-549.
82. Junginger J., Schwittlick U., Lemensieck F., Nolte I., Hewicker-Trautwein M.: Immunohistochemical investigation of Foxp3 expression in the intestine in healthy and diseased dogs. *Vet. Res.* 2012, 43: 23.
83. Kayes S.G.: Inflammatory and immunological responses to *Toxocara canis*. In: C.V. H, H.V. S, editors. *Toxocara: the enigmatic parasite*. Trowbridge, UK: Cromwell Press; 2006, 158-173.
84. Khalil H.M.: Toxocariasis in Egypt. *J. Egypt Public Health Assoc.* 1977, 52 (5): 330-343.
85. Kincekova J., Reiterova K., Dubinsky P.: Larval toxocariasis and its clinical manifestation in childhood in the Slovak Republic. *J. Helminthol.* 1999, 73(4): 323-328.
86. Kolbeková P., Kolárová L., Vetvicka D., Syrycek M.: Imaging of *Toxocara canis* larvae labelled by CFSE in BALB/c mice. *Parasitol. Res.* 2011, 108: 1007-1014.
87. Kooijman R., Gerlo S., Coppens A., Hooghe-Peters E.L.: Growth hormone and prolactin expression in the immune system. *Ann. NY. Acad. Sci.* 2000, 917: 534-540.

88. Kramer F., Vollrath T., Schnieder T., Epe C.: Improved detection of endoparasite DNA in soil sample PCR by the use of anti-inhibitory substances. *Vet. Parasitol.* 2002, 108: 217-226.
89. Krege J.H., Hodgin J.B., Couse J.F., Enmark E., Warner M., Mahler J.F., Sar M., Korach K.S., Gustafsson J.A., Smithies O.: Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1998, 95 (26): 15677-15682.
90. Krishnan L., Guilbert L.J., Russell A.S., Wegmann T.G., Mosmann T.R., Belosevic M.: Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to *Leishmania major* infection and causes decreased antigen-specific IFN-gamma response and increased production of T helper 2 cytokines. *J. Immunol.* 1996, 156 (2): 644-652.
91. Kurtz A., Bristol L.A., Tóth B.E., Lazar-Wesley E., Takács L., Kacsóh B.: Mammary epithelial cells of lactating rats express prolactin messenger ribonucleic acid. *Biol. Reprod.* 1993, 48 (5): 1095-1103.
92. Lamberts S.W., Macleod R.M.: Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiol. Rev.* 1990, 70 (2): 279-318.
93. Lescano S.Z., Queiroz M.L., Chieffi P.P.: Larval recovery of *Toxocara canis* in organs and tissues of experimentally infected *Rattus norvegicus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2004, 99 (6): 627-628.
94. Lightner L., Christenses B.M., Beran G.W.: Epidemiologic findings on canine and feline intestinal nematode infections from records of the Iowa state University Veterinary Clinic. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1978, 172 (5): 564-567.
95. Limaye A.P., Abrams J.S., Silver J.E., Ottesen E.A., Nutman T.B.: Regulation of parasite-induced eosinophilia: selectively increased interleukin 5 production in helminth-infected patients. *J. Exp. Med.* 1990, 172 (1): 399-402.

96. Lombardero M., Quintanar S.A., Vidal S., Horvath E., Kovacs K., Lloid R.V., Scheithauer B.W.: Vascularization of rat pituitary autografts. *J. Anat.* 2006, 208: 587-593.
97. MacAdam I., Gudan D., Timbs D.V., Urguhart H.R., Sewell M.M.: Metazoan parasites of dogs in Sabah, Malaysia. *Trop. Anim. Health Prod.* 1984, 16 (1): 34-38.
98. Magnaval J.F., Malard L., MOrassin B., Fabre R.: Immunodiagnosis of ocular *Toxocariasis* using western-blot for the detection of specific anti-*Toxocara* IgE. *J. Helminthol.* 2002, 76: 335-339.
99. Maizels R.M.: Infections and allergy - helminths, hygiene and host immune regulation. *Curr. Opin. Immunol.* 2005, 17 (6): 656-661.
100. Maizels R.M.: *Toxocara canis*: Molecular basis of immune recognition and evasion. *Vet. Parasitol.* 2013, 193 (4): 365-374.
101. Maizels R.M., Kennedy M.W., Meghji M., Robertson B.D., Smith H.V.: Shared carbohydrate epitopes on distinct surface and secreted antigens of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *J. Immunol.* 1987, 139 (1): 207-214.
102. Maizels R.M., Savigny D., Oglive B.M.: Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. *Parasitol. Immunol.* 1984, 6 (1): 23-37.
103. Marron J.A., Schroeder R.J.: Survey of *Toxocara canis* infection rate in impounded dogs in Los Angeles County. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1978, 172 (6): 713.
104. Martínez-Barbosa I., Fernández Presas A.M., Vázquez Tsuji O., Ruiz Hernández A.: Frecuencia de *Toxocara canis* en perros y áreas verdes del sur de la ciudad de México, Distrito Federal. *Vet. Méx.* 1998, 29(3): 239-244.
105. Martínez L.J.P.: Detección del depósito de antígenos de excreción-secretión de larvas somáticas de *Toxocara canis* en los tejidos de jerbos con infección inducida. Tesis de maestría. UNAM. 2004.

106. Martínez-Moreno F.J., Hernández S., López-Cobos E., Becerra C., Acosta I., Martínez-Moreno A.: Estimation of canine intestinal parasites in Córdoba (Spain) and their risk to public health. *Vet. Parasitol.* 2007, 143 (1): 7-13.
107. Maswoswe S.M., Peters W., Warhurst D.C.: Corticosteroid stimulation of the growth of *Plasmodium falciparum* gametocytes *in vitro*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1985, 79 (6):607-616.
108. Matera L.: Action of pituitary and lymphocyte prolactin. *Neuroimmunomodulation.* 1997, 4 (4): 171-180.
109. Matera L., Cesano A., Bellone G., Oberholtzer E.: Modulatory effect of prolactin on the resting and mitogen-induced activity of T, B, and NK lymphocytes. *Brain Behav. Immun.* 1992, 6 (4):409-417.
110. Matsumura K., Endo R.: Investigation of antibodies against *Toxocara canis* in naturally infected puppies. *Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg. A.* 1982, 253 (1): 139-143.
111. Matsumura K., Kazuta Y., Endo R., Tanaka K.: The IgM antibody activities in relation to the parasitologic status of *Toxocara canis* in dogs. *Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg. A.* 1983, 255 (2-3): 402-405.
112. Maurer R.A.: Estradiol regulates the transcription of the prolactin gene. *J. Biol. Chem.* 1982,257 (5): 2133-2136.
113. Meeusen E.N., Balic A.: Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? *Parasitol. Today.* 2000, 16 (3): 95-101.
114. Meghji M., Maizels R.M.: Biochemical properties of larval excretory-secretory glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1986, 18 (2): 155-170.
115. Mendez I., Cariño C., Díaz L.: La prolactina en el sistema inmunológico: aspectos de síntesis y efectos biológicos. *Rev. Invest. Clin.* 2005, 57 (3): 447-456.
116. Mirzaei M., Fooladi M.: Prevalence of intestinal helminthes in owned dogs in Kerman city, Iran. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 2012, 5 (9): 735-737.

117. Moore K.W., de Waal Malefyt R., Coffman R.L., O'Garra A.: Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 2001, 19: 683-765.
118. Morales-Montor J.: Mecanismos de evasión de la respuesta inmune utilizados por los parásitos. *Bol. Educ. Bioq.* 1995, 14: 5-11.
119. Morales-Montor J., Larralde C., Arteaga M., Govezensky T., Romano M.C., Morali G.: Inhibition of sexual behavior in male mice infected with *Taenia crassiceps* cysticerci. *J. Parasitol.* 1996, 82 (5): 689-693.
120. Morales-Montor J., Mohamed F., Ghaleb A.M., Baig S., Hallal-Calleros C., Damian R.T.: *In vitro* effects of hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) hormones on *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 2001, 87 (5): 1132-1139.
121. Moreira-Silva S.F., Rodrigues M.G., Pimenta J.L., Gomes C.P., Freire L.H., Pereira F.E.L.: Toxocariasis of the central nervous system: with report of two cases. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2004, 37(2): 169-174.
122. Mukaratirwa S., Singh V.P.: Prevalence of gastrointestinal parasites of stray dogs impounded by the Society for the Prevention of Cruelty to Animals (SPCA), Durban and Coast, South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 2010, 81 (2): 123-125.
123. Muñoz-Guzmán M.A., Alba-Hurtado F.: Secretory-Excretory antigens of *Toxocara canis* recognized by puppies of the Mexico City metropolitan area. *Vet. Mex.* 2010, 41 (1): 59-64.
124. Muñoz-Guzmán M.A., Del Río-Navarro B.E., Valdivia-Anda G., Alba-Hurtado F.: The increase in seroprevalence to *Toxocara canis* in asthmatic children is related to cross-reaction with *Ascaris suum* antigens. *Allergol. Immunopathol.* 2010, 38 (3): 115-121.
125. Nagy D., Bede O., Danko J., Szénási Z., Sipka S.: Analysis of serum cytokine levels in children with chronic cough associated with *Toxocara canis* infection. *Parasite Immunol.* 2012, 34 (12): 581-588.

126. Nagy E., Berczi I.: Hypophysectomized rats depend on residual prolactin for survival. *Endocrinology*. 1991, 128 (6): 2776-2784.
127. Nagy E., Berczy I.: Immunodeficiency in hypophysectomized rats. *Acta. Endocrinol.* 1978, 89 (3): 530-537.
128. Nagy E., Berczi I., Friesen H.G.: Regulation of immunity in rats by lactogenic and growth hormones. *Acta. Endocrinol.* 1983, 102 (3): 351-357.
129. Nagy E., Berczi I., Wren G.E., Asa S.L., Kovacs K.: Immunomodulation by bromocriptine. *Immunopharmacology*. 1983, 6 (3): 231-243.
130. Nevalainen M.T., Valve E.M., Ingleton P.M., Nurmi M., Martikainen P.M., Harkonen P.L.: Prolactin and prolactin receptors are expressed and functioning in human prostate. *J. Clin. Invest.* 1997, 99 (4): 618-627.
131. Nichols R.L.: The etiology of visceral larva migrans. I. Diagnostic morphology of infective second-stage *Toxocara* larvae. *J. Parasitol.* 1956, 42(4): 349-362.
132. Norhaida A., Suharni M., Liza Sharmini A.T., Tuda J., Rahmah N.: rTES-30USM: Cloning via assembly PCR, expression, and evaluation of usefulness in the detection of Toxocariasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 2008, 102(10): 151-160.
133. Noya O., Alarcón de Noya B.: The multiple antigen blot assay (MABA): A simple immunoenzymatic technique for simultaneous screening of multiple antigens. *Immunol. Lett.* 1998, 63: 53-56.
134. Oge H., Oge S.: Quantitative comparison of various methods for detecting eggs of *Toxocara canis* in samples of sand. *Vet. Parasitol.* 2000, 92: 75-79.
135. Oliveira-Sequeira T.C.G., Amarante A.F.T., Ferrari T.B., Nunes L.C.: Prevalence of intestinal parasites in dogs from Sao Paulo State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 2002, 103: 19-27.
136. O'Lorcain P.: Epidemiology of *Toxocara spp.* in stray dogs and cats in Dublin, Ireland. *J. Helminthol.* 1994, 68 (4): 331-336.

137. Othman R.A.: Prevalence of *Toxocara canis* in dogs, North West Bank of Palestine. *Korean J. Parasitol.* 2011, 49 (2): 181-182.
138. Overgaauw P.A.: Aspects of *Toxocara* epidemiology: Toxocariasis in dogs and cats. *Crit. Rev. Microbiol.* 1997, 23(3): 233-251.
139. Overgaauw P.A.: Prevalence of intestinal nematodes of dogs and cats in The Netherlands. *Vet. Q.* 1997 (b), 19 (1): 14-17.
140. Overgaauw P.A., Okkens A.C., Bevers M.M., Kortbeek L.M.: Incidence of patent *Toxocara canis* infections on bitches during the oestrus cycle. *Vet. Quart.* 1998, 20(3): 104-107.
141. Pearson J.C., Bowman D.D., Grieve R.B.: Tissue localization of excretory-secretory antigens of larval *Toxocara canis* in acute and chronic murine toxocariasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1986, 35 (5): 974-981.
142. Pecinali N.R., Gomes R.N., Amendoeira F.C., Bastos A.C., Martins M.J., Pegado C.S., Bastos O.M., Bozza P.T., Castro-Faria-Neto H.C.: Influence of murine *Toxocara canis* infection on plasma and bronchoalveolar lavage fluid eosinophil numbers and its correlation with cytokine levels. *Vet. Parasitol.* 2005, 134 (1-2): 121-130.
143. Peixoto P.L., Nascimento E., Cançado G.G., Miranda R.R., Rocha R.L., Araújo R.N., Fujiwara R.T.: Identification of candidate antigens from adult stages of *Toxocara canis* for the serodiagnosis of human toxocariasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2011, 106 (2): 200-206.
144. Pinelli E., Aranzamendi C.: *Toxocara* infection and its association with allergic manifestations. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug. Targets.* 2012, 12 (1): 33-44.
145. Pinelli E., Dormans J., Fonville M., van der Giessen J.: A comparative study of toxocariasis and allergic asthma in murine models. *J. Helminthol.* 2001, 75 (2): 137-140.
146. Posner B.I., Kelly P.A., Shiu R.P., Friesen H.G.: Studies of insulin, growth hormone and prolactin binding: tissue distribution, species variation and characterization. *Endocrinology.* 1974, 95 (2): 521-531.

147. Prigent-Tessier A., Tessier C., Hirosawa-Takamori M., Boyer C., Ferguson-Gottschall S., Gibori G.: Rat decidual prolactin: Identification, molecular cloning, and characterization. *J. Biol. Chem.* 1999, 274 (53): 37982-37989.
148. Pullola T., Vierimaa J., Saari S., Virtala A.M., Nikander S., Sukura A.: Canine intestinal helminths in Finland: prevalence, risk factors and endoparasite control practices. *Vet. Parasitol.* 2006, 140: 321-326.
149. Quintanar S.A., Quintanar S.J.L.: Hipofisectomía transfaringea en la rata (Descripción de la técnica). *Vet. Méx.* 1994, 25 (1): 13-17.
150. Quiroz R.: Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Ed. Limusa. México, D.F. 2003.
151. Ramírez-Barríos R.A., Barboza-Mena G., Muñoz J., Angulo-Cubillán F., Hernández E., González F., Escalona F.: Prevalence of intestinal parasites in dogs under veterinary care in Maracaibo, Venezuela. *Vet. Parasitol.* 2004, 121 (1-2): 11-20.
152. Rayes A.A., Lambertucci J.R.: Human toxocariasis as a possible cause of eosinophilic arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2001, 40: 109-110.
153. Roberts C.W., Walker W., Alexander J.: Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001, 14 (3): 476-488.
154. Rodríguez-Vivas R.I., Gutierrez-Ruiz E., Bolio-González M.E., Ruiz-Piña H., Ortega-Pacheco A., Reyes-Novelo E., Manrique-Saide P., Aranda-Cirerol F., Lugo-Perez J.A.: An Epidemiological study of intestinal parasites of dogs from Yucatan, Mexico, and their risk to public health. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011, 11 (8): 1141-1144.
155. Roddie G., Stafford P., Holland C., Wolfe A.: Contamination of dog hair with eggs of *Toxocara canis*. *Vet. Parasitol.* 2008, 152 (1-2): 85-93
156. Saeki H., Masu H., Yokoi H., Yamamoto M.: Long-term survey on intestinal nematode and cestode infections in stray puppies Ibaraki Prefecture. *J. Vet. Med. Sci.* 1997, 59 (8): 725-726.

157. Russell D.H., Kibler R., Matrisian L., Larson D.F., Poulos B., Magun B.E.: Prolactin receptors on human T and B lymphocytes: antagonism of prolactin binding by cyclosporine. *J. Immunol.* 1985, 134 (5):3027-3031.
158. Saleh F.C., Kirkpatrick C.E., De Haseth O., Lok J.B.: Occurrence of some blood and intestinal parasites in dogs in Curaçao, Netherlands Antilles. *Trop. Geogr. Med.* 1988, 40 (4): 318-321.
159. Seah S.K., Hucal G., Law C.: Dogs and intestinal parasites: A public health problem. *Can. Med. Assoc. J.* 1975, 112 (10): 1191-1194.
160. Shah G.N., Laird H.E., Russell D.H. Identification and characterization of a prolactin-like polypeptide synthesized by mitogen-stimulated murine lymphocytes. *Int. Immunol.* 1991, 3 (4): 297-304.
161. Sharghi N., Schantz P.M., Caramico L., Ballas K., Teague B.A., Hotez P.J.: Environmental exposure to *Toxocara* as a possible risk factor for asthma: a clinic-based case-control study. *Clin. Infect. Dis.* 2001, 32 (7): E111-E116.
162. Shaw-Bruha C.M., Pirruccello S.J., Shull J.D.: Expression of the prolactin gene in normal and neoplastic human breast tissues and human mammary cell lines: promoter usage and alternative mRNA splicing. *Breast Cancer res. Treat.* 1997, 44 (3): 243-253.
163. Sher A.: Regulation of cell-Mediated immunity by parasites: The ups and downs of an important host adaptation. *Mol. App. Parasitol.* 1995 (12): 431-442.
164. Smith H.R.N.: Diagnostic limitations and future trends in the serodiagnosis of human toxocarosis. C.V.H, H.V. S, editors. *Toxocara: the enigmatic parasite.* Towbridge, UK: Cromwell Press. 2006, 89-112.
165. Smith H.V., Quinn R., Bruce R.G., Girdwood R.W.: Development of the serological response in rabbits infected with *Toxocara canis* and *Toxascaris leonina*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1982, 76 (1): 89-94.
166. Smith P.E.: The effect of hypophysectomy upon the involution of the thymus in the rat. *Anatom. Rec.* 1930, 47: 119-129.

167. Soulsby E.J.: Toxocariasis. Br Vet J. 1983, 139 (6): 471-475.
168. Sowemimo O.A.: The prevalence and intensity of gastrointestinal parasites of dogs in Ile-Ife, Nigeria. J. Helminthol. 2009, 83 (1): 27-31.
169. Spady T.J., McComb R.D., Shull J.D.: Estrogen action in the regulation of cell proliferation, cell survival, and tumorigenesis in the rat anterior pituitary gland. Endocrine. 1999, 11 (3): 217-233.
170. Spangelo B.L., Macleod R.M.: The role immunopeptides in the regulation of anterior pituitary hormone release. Trends Endocrinol. Metab. 1990, 1 (8): 408-412.
171. Sugane K., Oshima T.: Eosinophilia, granuloma formation and migratory behaviour of larvae in the congenitally athymic mouse infected with *Toxocara canis*. Parasite Immunol. 1982, 4 (5): 307- 318.
172. Tan D., Walker A.M.: Short form 1b human prolactin receptor down-regulates expression of the long form. J. Mol. Endocrinol. 2010, 44 (3):187-194.
173. Tarish J.H., Al-Saqr I.M., Al-Abbassy S.N., Kadhim F.S.: The prevalence of parasitic helminths in stray dogs in the Baghdad area, Iraq. Ann. Trop. Med. Parasitol. 1986, 80 (3): 329-331.
174. Tonelli L.H., Postolache T.T.: Tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, interleukin-6 and major histocompatibility complex molecules in the normal brain and after peripheral immune challenge. Neurol. Res. 2005, 27 (7): 679-684.
175. Torina A., Caracappa S., Barera A., Dieli F., Sireci G., Genchi C., Deplazes P., Salerno A.: *Toxocara canis* infection induces antigen-specific IL-10 and IFNgamma production in pregnant dogs and their puppies. Vet. Immunol. Immunopathol. 2005, 108 (1-2): 247-251.
176. Turner T., Pegg E.: A survey of patent nematode infestations in dogs. Vet. rec. 1977, 100 (14): 284-285.

177. Tylkowska A., Pilarczyk B., Gregorczyk A., Templin E.: Gastrointestinal helminths of dogs in Western Pomerania, Poland. *Wiad. Parazytol.* 2010, 56 (3): 269-276.
178. Ugochukwu E.I., Ejimadu N.K.: Studies on the prevalence of gastrointestinal helminths of dogs in Calabar, Nigeria. *Int. J. Zoonoses.* 1985, 12 (3): 214-218.
179. Valkounová J.: Parasitological investigation of children's sandboxes and dog faeces from public areas of housing development in Prague. *Folia Parasitol.* 1982, 29 (2): 133-138.
180. Valli J.L., Williamson A., Sharif S., Rice J., Shewen P.E.: *In vitro* cytokine responses of peripheral blood mononuclear cells from healthy dogs to distemper virus, *Malassezia* and *Toxocara*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2010, 134 (3-4): 218-229.
181. Vanparijs O., Hermans L., van der Flaes L.: Helminth and protozoan parasites in dogs and cats in Belgium. *Vet. Parasitol.* 1991, 38 (1): 67-73.
182. Venturini L., Radman N.: Frecuencia de *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum* y *Giardia sp* según el sexo y la edad en caminos de La plata (Bs. AS., Argentina). *Rev. Med. Vet.* 1988, 69: 161.165.
183. Verster A.: Gastro-intestinal helminths of domestic dogs in the Republic of South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 1979, 46 (2): 79-82.
184. Viselli S.M., Stanek E.M., Mukherjee P., Hymer W.C., Mastro A.M.: Prolactin-induced mitogenesis of lymphocytes from ovariectomized rats. *Endocrinology.* 1991, 129 (2): 983-990.
185. Vossman T., Stoye M.: Clinical, hematologic and serologic findings in puppies after prenatal infection with *Toxocara canis* Werner 1782 (Anisakidae). *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 1986, 33 (8): 574-585.
186. Wachira T.M., Sattran M., Zeyhle E., Njega M.K.: Intestinal helminths of public health importance in dogs in Nairobi. *East Afr. Med. J.* 1993, 70 (10): 617-619.

187. Wang C.R., Qiu J.H., Zhao J.P., Xu L.M., Yu W.C., Zhu X.Q.: Prevalence of helminthes in adult dogs in Heilongjiang Province, the People's Republic of China. *Parasitol. res.* 2006, 99 (5): 627-630.
188. Weiss S.T.: Parasites and asthma/allergy: what is the relationship? *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000, 105 (2 Pt 1): 205-210.
189. Wilder H.R.: Nematode endophtalmitis. *Trans. An. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.* 1950, 55: 99-109.
190. Xhaxhiu D., Kusi I, Rapti D., Kondi E., Postoli R., Rinaldi L., Dimitrova Z.M., Visser M., Knaus M., Rehbein S.: Principal intestinal parasites of dogs in Tirana, Albania. *Parasitol. Res.* 2011, 108 (2): 341-353.
191. Xinou E., Lefkopoulos A., Gelagoti M., Drevelegas A., Diakou A., Milonas I., Dimitriadis A.S.: CT and MR imaging findings in cerebral toxocaral disease. *Amer. J. Neuroradiol.*, 2003, 24: 714-718.
192. Yacob H.T., Ayele T., Fikru R., Basu A.K.: Gastrointestinal nematodes in dogs from Debre Zeit, Ethiopia. *Vet. Parasitol.* 2007, 148 (2): 144-148.
193. Yamaguchi Y., Suda T., Suda J., Eguchi M., Miura Y., Harada N., Tominaga A., Takatsu K.: Purified interleukin 5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors. *J. Exp. Med.* 1998, 167 (1): 43-56.
194. Zimmermann U., Löwenstein M.D., Stoye M.: Migration and distribution of *Toxocara canis* Werner 1782 (Anisakidae) larvae in the definitive host (beagle) following primary infection and reinfection. *Zentralbl. Veterinamed. B.* 1985, 32 (1): 1-28.
195. Zinger M., McFarland M., Ben-Jonathan N.: Prolactin expression and secretion by human breast glandular and adipose tissue explants. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003, 88 (2): 689-696.