

Mtra. María Elena Contreras Garfias  
 Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
 PRESENTE

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
	26	8	21				

### Datos del Alumno

Nombre : Breni Itzel Álvarez Marroquín	
Matrícula : 2153075188	Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica <input type="checkbox"/>
Domicilio : San Jorge #80. Pedregal de Santa Úrsula. Coyoacán. CDMX. C.P: 04600	
Teléfono : 54216273	Celular : 5521943917
Correo Electrónico : breni.alvarezm@gmail.com	CURP : AAMB961031MDFLRR00

### Datos del Proyecto

Caracterización de anticuerpos monoclonales producidos contra productos de excreción secreción de	
Nombre del Proyecto : Toxocara canis (anti- PEST)	
Lugar donde se realizó el Servicio Social : Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos	
Dependencia : Secretaria de Salud	
Entidad Federativa : Distrito Federal	
Municipio : Álvaro Obregón	Localidad : Calle Francisco P Miranda #177
Fecha de Inicio	Fecha de Término
Día Mes Año 30 4 19	Día Mes Año 30 11 19

### PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector: 3.- Público  Tipo: 3.- Interno de Campo

Orientación: 10.- Otros

### FIRMAS

Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez

Asesor Interno  
 Nombre, firma y No. Económico 37622

Breni Itzel Álvarez Marroquín

Alumno  
 Nombre, firma

M. Yolanda Medina Flores

Asesor Externo  
 Nombre, firma y No. Económico

Felipe Mendoza Pérez  
 Vo. Bo. de la Comisión  
 Nombre y firma de la persona que autoriza



**CARTA TÉRMINO SERVICIO SOCIAL**

Ciudad de México, a 13 de enero de 2020

Mtro. Jesús Obdulio López Murillo  
Coordinador Divisional de Servicio social  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

**PRESENTE**

Por este conducto hacemos constar que la alumna Breni Itzel Álvarez Marroquín, estudiante de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo, con número de matrícula 2153075188, ha concluido satisfactoriamente el servicio social en el Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales, en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos "Dr. Manuel Martínez Báez" (InDRE), con el programa Sistema para el Diagnóstico de Laboratorio con Impacto en salud Pública, se realizó en un periodo comprendido del 30 de abril del 2019 al 30 de noviembre del 2019, con un horario de 9:00 a 13:00, cubriendo un total de 480 horas efectivas de trabajo.

**Atentamente**



**Edgar Adrian Ponce Lerma**  
Encargado del Área de Gestión para la Capacitación



INSTITUTO DE DIAGNOSTICO Y  
REFERENCIA EPIDEMIOLOGICOS  
"Dr. Manuel Martínez Báez" (InDRE)

Sección/Serie: 15.3

FJMP/eapl



Ciudad de México

**Mtra. María Elena Contreras Garfias**  
**Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud**  
**Universidad Autónoma Metropolitana**  
**PRESENTE**

Por medio de la presente informo a usted que la alumna Álvarez Marroquín Breni Itzel con número de matrícula 2153075188, quién cursó la Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica ha concluido satisfactoriamente su servicio social en Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) con el proyecto Caracterización de anticuerpos monoclonales producidos contra productos de excreción secreción de *Toxocara canis* (anti- PEST), en el periodo comprendido del 30 de Abril de 2019 al 30 de Noviembre de 2019, bajo mi asesoría cumpliendo con un total de 480 horas como marca el reglamento de Servicio Social.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente



---

M en C. Yolanda Medina Flores  
Asesor externo, jefa de área de Anticuerpos  
Monoclonales, 1620370



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**Unidad Xochimilco**

Ciudad de México

**Mtra. María Elena Contreras Garfias**  
**Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud**  
**Universidad Autónoma Metropolitana**  
**PRESENTE**

Por medio de la presente informo a usted que la alumna Álvarez Marroquín Breni Itzel con número de matrícula 2153075188, quién cursó la Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica ha concluido satisfactoriamente su servicio social en Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) con el proyecto Caracterización de anticuerpos monoclonales producidos contra productos de excreción secreción de *Toxocara canis* (anti- PEST), en el periodo comprendido del 30 de Abril de 2019 al 30 de Noviembre de 2019, cumpliendo con un total de 480 horas como marca el reglamento de Servicio Social

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente



---

Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez  
Profesor Investigador Titular C T.C.37622



**Universidad Autónoma Metropolitana  
Unidad Xochimilco**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Lugar de realización:

*Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales de la Coordinación de Investigaciones Inmunológicas del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos "Dr. Manuel Martínez Báez" (InDRE), ubicado en la Calle Francisco P Miranda No. 177. Col. Unidad Lomas de Plateros, Delegación Álvaro Obregón, México D.F, 01480, México.*

**Caracterización de anticuerpos monoclonales  
producidos contra productos de excreción secreción de  
*Toxocara canis* (anti- PEST)**

Reporte de proyecto de investigación

**Químico Farmacéutico Biológico**

Presenta:

**Breni Itzel Álvarez Marroquín**

Asesores:

**M. Yolanda Medina Flores**

Asesor externo, jefa de área de Anticuerpos Monoclonales

**Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez**

Asesor interno, coordinador del doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud

Fecha: CDMX, 2020

## Abreviaturas

<b>AcMo</b>	Anticuerpo monoclonal
<b>Ag ES</b>	Antígeno de excreción secreción
<b>DC</b>	Células dendríticas
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IgM</b>	Inmunoglobulina M
<b>IL</b>	Interleucina
<b>kDa</b>	Kilodaltones
<b>L2</b>	Larvas de segundo estadio
<b>L3</b>	Larvas de tercer estadio
<b>LME</b>	Larva migrans encubierta
<b>LMN</b>	Síndrome de larva migrans neurológica
<b>LMO</b>	Síndrome de larva migrans ocular
<b>LMV</b>	Síndrome de larva migrans visceral
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
<b>PBS</b>	Solución salina de fosfatos
<b>PC</b>	Fosforilcolina
<b>PEST</b>	Productos de excreción-secreción de L <sub>2</sub> de <i>T.canis</i>
<b>PM</b>	Peso molecular
<b><i>T. canis</i></b>	<i>Toxocara canis</i>
<b><i>WB</i></b>	<i>Western Blot</i>
<b>PEBP</b>	Proteína de unión a fosfatidiletanolamina

## Agradecimientos

A la M. Yolanda Medina, Olga Mata, Mario Valdivia, Dolores, Gabriela de la Rosa y Vianca del Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales de la Coordinación de Investigaciones Inmunológicas del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (InDRE), que con sus conocimientos me guiaron a la culminación del presente proyecto además de brindar una hermosa amistad y forjar un ambiente de trabajo ameno.

A mi alma mater la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco y a todos aquellos profesores que conformaron la generación 2015-2019 de la carrera de Química Farmacéutica Biológica, que formaron a sus alumnos conforme a su sistema modular y nos han permitido adquirir distintos conocimientos enfocados a los problemas que la sociedad presenta y poder abordarlos desde distintos puntos de vista.

# Caracterización de anticuerpos monoclonales producidos contra productos de excreción secreción de *Toxocara canis* (anti- PEST)

## Resumen

La *Toxocariasis* es una infección cosmopolita, ampliamente distribuida a nivel mundial, causada principalmente por *Toxocara canis*, el cual se encuentra entre los primeros tres nematodos más prevalentes en estudios llevados a cabo en perros de zonas urbanas de países como Perú, Argentina y México (Marín & Castaño, 2011). En México es una de las enfermedades con mayor desatención en humanos, en estos hospedadores puede causar ciertos síndromes de importancia clínica como LMV, LMO, LMN, LME y la asintomática. Sin embargo, la prevalencia de esta infección es difícil de establecer por la dificultad en el diagnóstico (Mosquera et al, 2014). En la actualidad se realiza la determinación de anticuerpos contra Ag-ES de *Toxocara canis*, utilizando la técnica de ELISA y posteriormente es confirmada por WB, lo que le aporta mayor sensibilidad y especificidad al diagnóstico (Delgado & Rodríguez, 2009), ya que pueden ocurrir reacciones cruzadas con infecciones por otros parásitos, principalmente otros ascáridos, por ello resulta difícil diagnosticar aquellos individuos que estén cursando con otras infecciones parasitarias. Por lo tanto, el objetivo fue caracterizar anticuerpos monoclonales (AcMo) murinos anti-PEST (anti-productos excreción-secreción *Toxocara canis*), así mismo se evaluaron las reacciones cruzadas de AcMo frente a antígenos de diferentes parásitos. Los anticuerpos IgG e IgM (anti - PEST) se evaluaron mediante ELISA y WB. Ninguno de los anticuerpos IgM (1E4 y 5E4) presento reactividad cruzada con algún otro antígeno de los que se evaluaron en el presente trabajo. Sin embargo, el anticuerpo IgG 1E4 reconoció a antígenos de parásitos como *Ascaris lumbricoídes*, *Taenia crassiceps* (Extracto crudo), *Ascaris sp* y *Taenia saginata*. Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede decir que los AcMo caracterizados como IgM son útiles en pruebas de diagnóstico, ya que no reaccionan con ninguno de los antígenos empleados en este trabajo. Sin embargo, se debería aprovechar la característica del anticuerpo 1E4 de reaccionar cruzadamente con otros helmintos ascáridos para la elección de proteínas que puedan servir para vacunas futuras que se dirijan a ambos padecimientos.

## Antecedentes

### Toxocariasis

Una de las infecciones más comunes en todo el mundo causadas por parásitos es la toxocariasis (Del Río et al, 2018), la cual es una zoonosis parasitaria (Uribarren, 2018), causada por la infestación de un áscarí intestinal (nematodo) del género *Toxocara* (Relly et al, 2018). Las especies involucradas de la *Toxocara* zoonótica son *T. canis* (parásito de cánidos, entre ellos perros, zorros, lobos, coyotes), *T. cati* (de felinos), *T. vitulorum* (de bovinos) y posiblemente *T. pteropodis* (de los murciélagos frugívoros). Otras dos especies *T. malayasiensis* en el gato doméstico y *T. lynxus* en linceos africanos. También se incluyen especies *T. tanuki*, *T. alienata* y *T. mackerrasae* encontradas en roedores y otros animales silvestres, donde aún no se registra el potencial zoonótico de estos microorganismos (CFSPH & IICAB, 2005).

Las formas clínicas de la enfermedad se clasifican según el órgano afectado; en los humanos se han descrito diversos síndromes entre ellos se identifican dos formas clínicas “clásicas”: larva migrans visceral (LMV), larva migrans ocular (LMO) (Relly et al, 2018), sin embargo, en la actualidad se consideran la larva migrans neurológica (LMN) (algunos autores lo incluyen dentro de la forma visceral), larva migrans encubierta (Uribarren, 2018) y la toxocariasis asintomática (CFSPH & IICAB, 2005; De la Fé et al, 2006); la naturaleza de la forma clínica dependerá del tamaño del inóculo, frecuencia y duración de la infección, edad del paciente, distribución de las larvas en los tejidos, etc (Kaminsky, et al 2014).

- Larva migrans ocular (forma localizada): La larva puede entrar al ojo ya sea directamente por vía de la coroides, ciliar, de las arterias centrales de la retina o bien pasar al ojo luego de un período de enquistamiento en tejidos adyacentes. Los síntomas pueden incluir leucocoria (pupilas blancas), disminución de la agudeza visual, estrabismo, dolor ocular y la eosinofilia (presente en el 10-15% de los pacientes). La pérdida de la visión puede ser progresiva o repentina, y puede ser permanente. La infección es a menudo unilateral, y una sola larva es típicamente responsable de los síntomas; sin embargo, también se han registrado infecciones bilaterales. Esta forma es predominante en edad pediátrica y puede originar ceguera en el 64% de los casos (Relly et al, 2018; CFSPH & IICAB, 2005; Roldán et al, 2010; & Kinčeková et al, 2008).

- Larva migrans visceral: Los signos típicos en los niños afectados más gravemente incluyen eosinofilia crónica, malestar general, fiebre, hepatomegalia y molestias en la región abdominal superior. Algunos pacientes también pueden presentar síntomas inespecíficos tales como náuseas, vómitos y signos respiratorios. También se han registrado exantema prurítico, urticaria crónica, linfadenopatía, artralgia, mialgia, edema angioneurótico y signos neurológicos. En los adultos, puede presentarse como un síndrome febril, debilidad y signos intestinales. Los síntomas de toxocariasis pueden persistir por meses. Las muertes son poco frecuentes, pero se han observado casos de miocarditis, meningoencefalitis eosinofílica o neumonía grave (Relly et al, 2018; CFSPH & IICAB, 2005).
- Larva migrans neurológica o neurotoxocariosis: Suele presentarse con síntomas inespecíficos o incluso puede ser asintomática, además son raras y el patrón clínico puede ser el de meningitis eosinofílica, encefalitis, mielitis, convulsiones, vasculitis déficit neurológico o cambios de comportamiento aislados (Kinčeková et al, 2008). En el cerebro las larvas no se encuentran encapsuladas, y la migración de las mismas deja pequeños focos de necrosis e infiltrados inflamatorios a su paso; esto hace que la sintomatología neurológica sea tan variada (Breña et al, 2011).
- Larva migrans encubierta Toxocariasis encubierta: Esta presentación puede ocurrir en individuos de cualquier edad y está caracterizada por manifestaciones clínicas inespecíficas que no corresponden a las categorías anteriores, tales como compromiso pulmonar (asma, bronquitis, neumonitis), dermatológico (urticaria crónica o eczema), linfadenopatías, miositis, debilidad crónica, dolor abdominal, tos, trastornos del sueño, dolor de cabeza, cambios de conducta entre otras. Los síntomas de la forma encubierta pueden durar meses o años. El diagnóstico se basa en una fuerte sospecha diagnóstica asociado a presencia de serología *anti-Toxocara* positiva, IgE elevado y/o eosinofilia, aunque en ocasiones no siempre se asocia con eosinofilia (Breña et al, 2011; CFSPH & IICAB, 2005).
- Toxocariasis asintomática: La infección en humanos usualmente es asintomática o cursan con síntomas inespecíficos. La toxocariosis asintomática diagnosticada por serología positiva ocurre principalmente en infecciones viejas o leves y puede o no estar acompañada de eosinofilia. La toxocariasis puede persistir durante varios años como una infección crónica y la reactivación de las larvas enquistadas puede ocurrir en individuos inmunocomprometidos (About-I-F, 2018).

La importancia de este parásito no es sólo por sus repercusiones en perros, sino porque también es una causa importante de zoonosis, debido a la amplia coexistencia que ha generado el hombre con perros y gatos domésticos. (Del Río et al, 2018; Muñoz & Alba, 2010). Por lo tanto, en nuestros ambientes rurales y suburbanos, se considera que la principal especie patógena del género *Toxocara* es: *T. canis* (Uribarren, 2018), ya que se reporta con más frecuencia en humanos (Relly et al, 2018).

### *Toxocara canis*

Según su clasificación taxonómica (Tabla 1) se ubica en el phylum *Nemathelminthes*, orden *Ascaridida* y familia *Toxocaridae*, por lo tanto, son nematodos o gusanos cilíndricos, nacarados y no segmentados; presentan cutícula, hipodermis y células musculares, y son pseudocelomados (cavidad corporal interior). Tienen aparato digestivo completo (boca trilabiada, intestino y ano), así como sistemas excretor, nervioso y reproductor. Son dioicos y presentan dimorfismo sexual (Becerril, 2011).

Las especies del género *Toxocara* pueden ser distinguidas entre sí teniendo como base la morfología de los labios, las aletas cervicales, longitud de las espículas y las características del aparato reproductor femenino (De la Fé et al, 2006). A grandes rasgos el ciclo reproductivo (Figura 1) de este parásito se conforma por los huevos fecundados, huevos larvados, L2, L3 y larvas adultas:

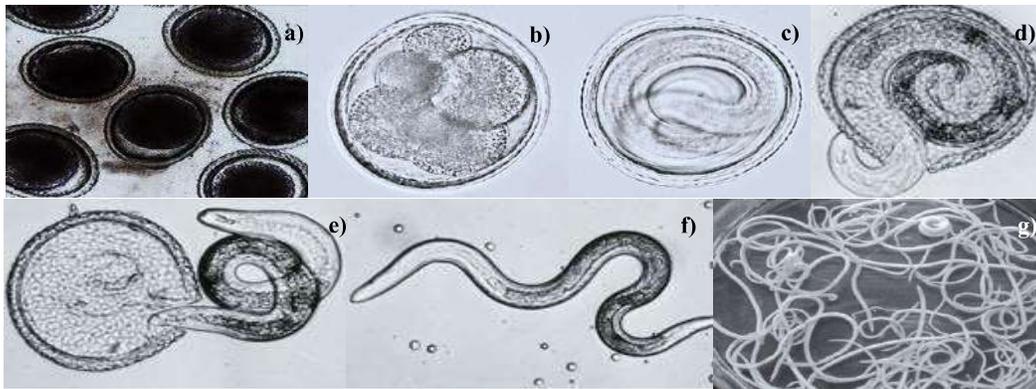
- **Huevos fecundados (no infectantes):** Son semiesféricos, en el protoplasma se aprecia con un aspecto granuloso adherentes y presentan un blastómero; miden 85-95 µm por 75-

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *T. canis* (De la Fé et al, 2006).

<b>Dominio:</b>	<i>Eukaryota</i>
<b>Reino:</b>	<i>Animalia</i>
<b>Subreino:</b>	<i>Bilateria</i>
<b>Rama:</b>	<i>Protostomia</i>
<b>Infrareino:</b>	<i>Ecdysozoa</i>
<b>Superphylum:</b>	<i>Aschelminthes</i>
<b>Phylum:</b>	<i>Nemathelminthes</i>
<b>Clase:</b>	<i>Secernentea</i>
<b>Subclase:</b>	<i>Rhabditia</i>
<b>Orden:</b>	<i>Ascaridida</i>
<b>Suborden:</b>	<i>Ascaridina</i>
<b>Superfamilia:</b>	<i>Ascaridoidea</i>
<b>Familia:</b>	<i>Toxocaridae</i>
<b>Genero:</b>	<i>Toxocara</i>
<b>Especie:</b>	<i>canis</i>

90  $\mu\text{m}$  (De la Fé et al, 2006). Están formados por tres capas: quitinosa, vitelina y proteinácea gruesa, ornamentada y con pequeñas hendiduras.

- **Huevos larvados:** Soportan la desecación por su cubierta muy resistente, lo cual favorece su transmisión (CFSPH & IICAB, 2005), pero su desarrollo depende de las condiciones de temperatura y humedad del ambiente. Se estima que el desarrollo se completa en tres semanas, cuando la temperatura es de 22 a 25 °C. No se producen larvas a temperaturas inferiores a 10 °C y las larvas mueren por debajo de las temperaturas de  $-15$  °C (Overgaaauw, 1997).
- **Larvas de segundo estadio (L2) o larvas somáticas:** Son aquellas larvas que salen de los huevos, miden 360  $\mu\text{m}$  de largo y 20  $\mu\text{m}$  de diámetro. La cutícula es estriada, y la cavidad bucal en posición subterminal y dorsalmente inclinada está rodeada de tres labios desarrollados cuya función es la recolección de alimento y el anclaje de los tejidos durante la migración (Ponce et al, 2014).
- **Larvas de tercer estadio (L3):** Es considerada la etapa infecciosa, que se alcanza después de dos mudas (Overgaaauw, 1997), tiene lugar en los pulmones, posteriormente ascienden por el *tractus* respiratorio, donde son deglutidas y pasan nuevamente al intestino delgado donde sufren la cuarta y última muda que constituye el paso a la fase adulta (De la Fé et al, 2006).
- **Adultos:** El macho mide de 4 a 6 cm y la hembra es mayor llegando a alcanzar de 6 a 10 cm. En la región cervical de ambos sexos existen aletas que son mucho más largas que anchas, miden de 2 a 4 mm por 0,2 mm. (De la Fé et al, 2006).



**Figura 1. Ciclo de vida de *T. canis*:** a) Huevos no embrionados (FaresTaie Instituto de Análisis. 2019). b) Mórula c) Larva en huevo embrionado (Pal, 2010). d) Comienzo de la eclosión. e) Eclosión. f) Larva. Imagen Editada de Global Health, Division of Parasitic Diseases. (2019). g) Adultos (Thomas et al, 2016).

### Transmisión y ciclo de vida

*T. canis* es eliminado de los cánidos como huevos, larvas u oocistos en el medio ambiente (Muñoz & Alba, 2010), aunado a ello, se encuentran disposiciones de otros huevos como *Ancylostoma caninum* o *Echinococcus spp.* o quistes y oocistos de protozoos (*Giardia spp* o *Cryptosporidium spp.*) (Kaminsky, et al 2014).

Los huevos y los de otros helmintos áscaris no están embrionados y no son infecciosos cuando las heces de los perros pasan al medio ambiente, ya que necesitan condiciones ambientales adecuadas para continuar su desarrollo y volverse infectantes; posteriormente, generan resistencia a cambios del pH, frío y desecación. Los huevos en esta etapa infecciosa (huevos larvados, embrionados o larva de segundo estadio L2) pueden sobrevivir en circunstancias óptimas durante al menos un año, motivo por el que se le conoce como geohelminto (Pearson, 2019; Abou-El-Naga, 2018; Overgaaauw, 1997; Huapaya et al, 2009). El ciclo se repite cuando otros cánidos ingieren los huevos larvados (Ponce et al, 2014). Por otro lado, en estudios, se ha demostrado que los huevos de *T. canis* aparecen en el 2-88% de muestras de tierra recogidas en varios países y regiones; asimismo, pueden ingresar a las aguas residuales a través de los inodoros o la escorrentía de tormenta y se ha demostrado que pasan por el tratamiento de aguas residuales municipales y siguen siendo viables (Abou-El-Naga, 2018). En consecuencia, existe un riesgo de contaminación con heces de perros en áreas privadas y públicas como parques o jardines, las cuales representan una fuente importante de infección (Uribarren, 2018). A continuación, se describe la forma de infección en dos tipos de hospedadores:

### Hospedador definitivo “perro”

El desarrollo completo del ciclo biológico de *T. canis* requiere de un solo hospedero. Cuando otro perro ingiere los huevos infectantes o larvados, el pH ácido del estómago, el pH alcalino del duodeno y el ambiente anaerobio activan a las larvas y

eclosionan en el intestino delgado, penetran a la mucosa, y llegan a la circulación linfática y hemática, donde posteriormente se les encontrará en el hígado después de 24 horas de la infección, por vena cava inferior llegan al corazón y por arterias pulmonares al pulmón (tres a cinco días posinfección), rompen alvéolos pulmonares y alcanzan el estadio de L3, pasan a bronquios, tráquea, laringe, faringe y son deglutidos a esófago, llegan al estómago y alcanzan la fase adulta (cuarta muda) en el intestino delgado. Los machos fecundan a las hembras y los huevos en las heces se observan después de cuatro a cinco semanas de la infección; las hembras producen aproximadamente 70 000 huevos por día, mismos que se expulsan con la materia fecal de los perros, y como se mencionó anteriormente, los huevos no son infectantes; necesitan permanecer en el suelo de tres a cuatro semanas para que se desarrollen a huevos larvados de segundo estadio (fase infectante). Los parásitos adultos tienen un promedio de vida de cuatro meses; debido a esto, cada hembra puede eliminar millones de huevos (Ponce et al, 2014).

En perros adultos, el ciclo de vida es diferente, la mayoría de las larvas migratorias pasan a través de los capilares pulmonares y alcanzan la circulación sistémica. Estas larvas finalmente se filtran y se enquistan (forman una envoltura) en los tejidos del perro, donde permanecen latentes o forma “durmiendo” durante meses o más (Pottinger & Charles, 2014). No obstante, en la perra preñada se presentan los cambios hormonales y/o la inmunidad disminuida que estimulan a las larvas a reanudar el desarrollo, migrar a través de la placenta e infectar a las crías no nacidas. Las larvas también pueden pasar a los cachorros recién nacidos en la leche de su madre. Aproximadamente 4 semanas después del nacimiento, tanto los cachorros como la madre lactante comienzan a pasar grandes cantidades de huevos en sus heces, arrojados por los gusanos adultos que habitan en su tracto intestinal (Pottinger & Charles, 2014). En el intestino de los cachorros, un gran número de estos parásitos se caracteriza por una apariencia barrigada, vómitos, diarrea y pérdida de peso, como resultado de la mala absorción del intestino delgado y la reducción de la altura vellosa (Theodoridis et al, 2001).

En pocas palabras la toxocariosis es muy exitosa en cánidos debido a que éstos pueden adquirir la infección por cuatro vías: a) intrauterina (las larvas pasan de la placenta al feto), b) vía transmamaria (las larvas pasan por conductos mamarios), c) ingestión de huevos larvados de segundo estadio (que se encuentran en la tierra) llamada geofagia o pica y d) consumo de carne de hospederos paraténicos (roedores y aves) que contengan larvas de *T. canis*. Donde c y d se relacionan con el contagio en humanos. (Kaminsky, et al, 2014; Uribarren, 2018; Huapaya et al, 2009; Zibaei et al, 2015).

#### Hospedador paraténico “humano”

Las manifestaciones de la infección humana por larvas de *Toxocara* podrían dividirse en una *fase aguda* (que suele ser incierta e inespecífica), una *fase latente* y una *fase crónica* (Roldán et al, 2010).

La *fase aguda* de la infección ocurre inmediatamente después de la ingestión accidental de los huevos infectantes, dichos huevos sufren la acción digestiva de los jugos gástricos en el estómago y de las enzimas pancreáticas en el intestino delgado (Robertson et al, 1988), en el duodeno; los huevos eclosionan y liberan a las larvas de segunda/tercer etapa (L2/3) penetran el epitelio intestinal (Pearson, 2019) e ingresan al torrente sanguíneo y al sistema linfático para migrar al hígado que es primer órgano en ser afectado (Del Río et al, 2018; Muñoz & Alba, 2010; Cortés et al, 2015), en dicho órgano se desencadena una respuesta inflamatoria exagerada denominada hepatomegalia, ésta va a depender de la cantidad de larvas migrantes que logren ser ingeridas por el hospedero, ya que un minúsculo número de larvas puede lograr pasar desapercibido hacia la vena porta sin producir signos y desde allí, pueden ingresar al tejido muscular o viajar hacia otros órganos como el corazón, los pulmones, riñones y tejidos vascularizados; esta migración también puede incluir a órganos considerados inmunológicamente privilegiados como el globo ocular y el cerebro (Roldán et al, 2010; Archelli & Kozubsky, 2008; Zibaei et al, 2015). Según la localización, origina un síndrome característico como LMV, LMO, LME y LMN.

En los hospedadores paraténicos, como los humanos y los ratones, las larvas de *T. canis* no se desarrollan hasta la etapa adulta, sino que migran a través del tejido somático y persisten en la etapa infecciosa L3 durante largos períodos (Resende e al. 2015), ya que sólo en raras ocasiones las larvas se rompen en los alvéolos, son tosidas y tragadas para llegar al intestino y madurar hasta convertirse en adultos (Pottinger & Charles, 2014), o el parásito puede ser reprimido por la inmunidad y verse confinado a un tejido en particular y dependiendo de la capacidad de evasión de la respuesta inmune del parásito, este puede sobrevivir y mantenerse en *fase latente* (‘hipobióticas’) durante varios años (Abou-El-Naga, 2018) sin causar signos o síntomas relevantes para poder sospechar de su presencia en el organismo. Sin embargo, cuando existe un marcado proceso inflamatorio en los tejidos afectados, su sola presencia será causante de las manifestaciones futuras de la *fase crónica*. (Del Río et al, 2018; Muñoz & Alba, 2010; Cortés et al, 2015). No obstante, la mayoría de las personas infectadas pueden reprimir

de manera eficiente al parásito y destruirlo gracias a la activación de la respuesta inmunológica, de tal manera que solo quedarán por un tiempo anticuerpos contra el parásito como recuerdo de la infección.

### Inmunopatología

*Toxocara* posee estructuras y ciclos de vida extraintestinales e intestinales que se ven reflejados en el número de moléculas que son reconocidas por el sistema inmune del hospedero, el reconocimiento inicial es por parte de las células dendríticas (DC) mediado por receptores de patrones de reconocimiento (PRR) como los receptores tipo Toll (TLR) o lectina de tipo C (CLR) que reconocen predominantemente moléculas no proteicas, y la unión apropiada, puede conducir tanto a la estimulación de DC a través de la señalización intracelular como la endocitosis eficiente de antígenos glicosilados para la posterior presentación de antígenos al sistema inmune adaptativo (Schabussova et al, 2007; Ponce et al, 2014).

La diferenciación en Th1 o Th2 a partir de los linfocitos quiescentes se determina en la sinapsis inmunitaria, en función de las citocinas que están presentes y que funcionan como terceras señales durante el proceso de activación. La IL-12 promueve la transformación en células Th1 y la IL-4 promueve la transformación en células Th2 (Serrano, 2009). Esta división en 2 subtipos se basa en el panel de citocinas que éstos son capaces de secretar una vez activados, y con las que modulan a diversos tipos celulares. Se denomina Th1 a los linfocitos secretores de interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e interleucina 2 (IL-2), y se denomina TH2 a los linfocitos que liberan IL-4, IL-5 e IL-13. La IL-4 promueve el cambio de isotipos de células B a la producción de IgE, la IL-5 promueve la diferenciación, la adhesión vascular y la supervivencia de los eosinófilos (Overgaauw, PA. 1997), y la IL-13, tanto como IL-4 inducen la activación alternativa del macrófago o antiinflamatorios (M2), los cuales no son capaces de producir óxido nítrico a partir de L-arginina ni de controlar el desarrollo de patógenos intracelulares (Arpa, 2008; Długosz, Basałaj, & Zawistowska-Deniziak, 2019).

Tanto en estudios en humanos como en murinos muestran una respuesta predominante Th2, la cual normalmente coincide con la modulación descendente de la respuesta inflamatoria Th1. ya que al mismo tiempo que se activa respuesta Th2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  se modulan hacia abajo y las citocinas reguladoras IL-10 y TGF- $\beta$  se regulan al alza. Las respuestas inmunes Th1 y Th17 se inhiben fuertemente. Esta fuerte respuesta Th2 permite el establecimiento de grandes cargas de parásitos en diferentes tejidos, pero al mismo tiempo, protege a los ratones del desarrollo de patologías severas en los pulmones (Długosz et al, 2019; Resende e al. 2015).

Los clones Th2, juegan un papel clave en las células B autólogas para dirigir una respuesta inmune hacia los organismos infecciosos, estas células inducen la síntesis de IgG, IgA, IgM e IgE con la presencia del antígeno excretor/secretor de *T. canis* (Ag-EST) y los clones Th1 en las mismas condiciones inducen síntesis de IgG, IgA, IgM, pero no de IgE. La IgG específica, por lo general, es aparente en todas las fases de la infección y puede estar presente en niveles residuales durante períodos prolongados después de la infección activa, mientras que la IgM refleja la infección y la reinfección de fase aguda debido a la producción de Ag-ES por las larvas, incluso en hospedadores adultos infectados de larga duración. Los niveles de anticuerpos generalmente disminuyen lentamente (Theodoridis et al, 2011).

La presencia de células fagocíticas y líticas, así como de complemento y anticuerpos, pueden mediar la destrucción de muchos parásitos y eliminar infecciones. Sin embargo, las larvas que logran “escapar” de la respuesta inflamatoria a nivel intestinal y llegar a hígado, pulmones o cualquier otro órgano provocan un foco de inflamación o granuloma en torno al parásito, que se inicia por la producción de IL-1, IL-6, IL-8, TNF y factores del complemento que inducen la proliferación, activación y quimiotaxis de macrófagos, linfocitos y neutrófilos mediante el aumento de las moléculas de adhesión y la permeabilidad de los vasos sanguíneos locales (Ponce et al, 2014).

Sin embargo, la respuesta Th2 no es totalmente protectora contra *Toxocara* porque durante la infección los helmintos presentan un ciclo de vida que involucra diferentes estados de desarrollo cada uno con antígenos específicos derivados de las mudas de los estadios juveniles y en los que una cutícula nueva (con nuevos epítomos) desplaza a la anterior (Ponce et al, 2014), asimismo tiene la capacidad de deshacerse de su capa superficial cuando es atacado por anticuerpos y/o leucocitos (Loukas et al, 2000); permitiendo al nematodo evadir el sistema inmunitario del hospedero; porque además secretan inmunomoduladores capaces de disminuir la respuesta protectora del hospedero induciendo linfocitos T y B reguladores (Tregs y Bregs) que inducen la producción de IL-10 y TGF $\beta$ ; además promueven la síntesis de IgG/IgG4 y alteran diversas vías de señalización intracelular que cambian el fenotipo de las DC a DC2 (las cuales promueven una respuesta Th2) y el de los macrófagos a M2, activados alternativamente y con menos capacidad proinflamatoria. Como resultado, la infección helmíntica se asocia a un importante grado de inmunosupresión que limita la capacidad del hospedero para adquirir

inmunidad estéril (Caraballo, 2016). No obstante, normalmente el sistema inmune organiza un cuidadoso equilibrio entre las respuestas reguladoras, pro y antiinflamatorias para funcionar eficazmente contra la infección, pero la supervivencia crónica de las larvas en huéspedes paraténicos indica que esto no siempre puede tener éxito (Resende et al, 2015).

### Antígenos de excreción secreción

Cuando las larvas en estadio infeccioso de *T. canis* se mantienen *in vivo* e *in vitro*, se despliega una cantidad variable de moléculas excretadas o secretadas. Estos antígenos excretados-secretados de *T. canis* (Ag TES) son los productos exportados activamente a través de vías secretoras, los liberados de su capa superficial y aquellos que pueden difundirse o filtrarse del soma del parásito. *In vivo*, los antígenos "secretados" incluyen enzimas digestivas que emanan del intestino de gusanos adultos, así como el contenido uterino que liberan los gusanos hembras junto con los huevos o larvas en etapa de transmisión (Hewitson et al, 2009). Estos antígenos consisten en una mezcla de proteínas glicosiladas (Bowman et al, 1987), incluido un potente agente alergénico denominado TBA-1 (Martínez et al, 2014), se han identificado en los tejidos hepáticos y en el suero de ratones y perros infectados (Bowman et al, 1987). Estas proteínas confieren a las larvas la capacidad para evadir o bloquear la respuesta inmune del hospedero, de este modo pueden sobrevivir durante muchos años en los tejidos (Zhu et al, 2015).

El Ag EST son los primeros antígenos a los que se detecta una respuesta de anticuerpos después de la infección y actualmente nos proporcionan el antígeno objetivo más específico para el serodiagnóstico en humanos (Thomas et al, 2016); dichos antígenos comprenden al menos 870 proteínas con una amplia gama de funciones. Sin embargo, la mayoría de ellos (732 proteínas) tienen funciones desconocidas lo más notable son al menos 14 peptidasas, incluidas 7 serina proteasas (familias S1, S9 y S28), 3 proteasas aspárticas (familia A1), 3 cisteínas proteasas CA/CD (familias C1 y C13) y 1 metaloproteasa MA (M14 familia), así como 23 moléculas de adhesión celular (inmunoglobulinas, integrinas y cadherinas), 17 lectinas (tipo C) y 6 proteínas SCP/TAPS (homólogos de alérgenos de veneno) (Chen et al, 2018).

Otros representantes incluyen catepsinas, endopeptidasas de asparagilo (legumains), superóxido dismutasas, olfactomedina, aquaporina, y varias proteínas huérfanas, pero un complejo de glucoproteínas y proteínas con funciones conocidas han sido el foco principal, entre ellas se encuentran las mucinas (TES-120), que se originan del revestimiento de la superficie del parásito, lectinas tipo C (representadas por los productos secretados TES-32 y TES-70) (Sperotto et al, 2017; Chen et al, 2018), y productos adicionales muestran fuertes similitudes con las cisteínas proteasas conocidas, proteínas de unión a fosfatidiletanolamina, y otros ligandos (Tabla 2). Varias de estas proteínas incluyen un motivo conspicuo de 36 aminoácidos que contiene seis cisteínas. Este dominio (denominado NC6 o SXC) parece ser un módulo evolutivamente móvil, que en *T. canis* se combina con un espectro de diversos dominios funcionales en diferentes genes. (Maizels et al, 2000).

La cantidad de TES secretada por una larva *in vitro* puede variar de 0.1 a 2 o incluso 8 ng de proteína / larva / día; y la cantidad de Ag TES *in vivo* depende del número de huevos ingeridos (Morales et al, 2019). Dentro de TES, los componentes moleculares se describen por primera vez por su peso molecular en el análisis SDS-PAGE, con bandas principales evidentes a 26, 32, 45, 55, 70, 120 y 400 kDa (Maizels, 2013). Similares a los encontrados en un Western Blot (23.4kDa, 26.6 kDa, 32.4 kDa, 43.9 kDa y 55.6 kDa) (Ponce et al, 2014).

### Mucinas

*T. canis*, liberan grandes cantidades de Ag-TES, donde abundan las mucinas (n = 7), muchas de las cuales probablemente están fuertemente atacadas por los anticuerpos IgM (Chen et al, 2018), las mucinas están muy glicosiladas con dominios extensos ricos en serina-treonina que actúan como sitios de glicosilación ligada a O y N- acetilgalactosamina, se ha establecido que los azúcares dominantes son dos trisacáridos O- metilados. La microscopía inmunoelectrónica identificó estas mucinas como sintetizadas en grandes estructuras glandulares dentro de la larva y secretadas para formar una capa superficial alrededor del parásito. No solo se secretan grandes cantidades de mucinas, sino que la capa está unida libremente y se desprende de las larvas que sufren el ataque de los granulocitos del hospedero (Schabussova et al, 2007).

Las principales mucinas son MUC-1, -2 y -3 y con componentes menos abundantes MUC-4 y -5, de las cuales se habían identificado previamente en la familia de glucoproteínas TES-120 secretadas por este parásito, todas ellas difieren en estructura y las proporciones relativas de residuos de serina o treonina y un número variable de dominios de 36 aminoácidos y seis cisteínas (SXC) (Maizels, 2013). Los dominios SXC se encuentran en muchas proteínas de nematodos. Anticuerpos contra los dominios SXC de Tc-MUC-1 y Tc- MUC-3 reconocen a los miembros de TES-120 que migran de manera

diferente. La presencia de dominios SXC en todos los productos de mucina respalda la sugerencia de que el motivo SXC es necesario para el ensamblaje o exportación de mucina (Loukas et al, 2000).

Los grupos metilo adicionales representan la única diferencia entre estas estructuras y el antígeno H del grupo sanguíneo de mamíferos. La O- metilación crítica se encuentra en la fucosa (fuc) terminal. Se demostró que el resto Fuc en los antígenos de huevo de esquistosoma es responsable de la inducción de la capacidad de respuesta Th2, y de hecho esta estructura también puede actuar como un adyuvante al inducir la producción de anticuerpos contra la proteína acoplada. Los azúcares enlazados con O y N de diferentes especies de nematodos filariales también transportan fosforilcolina, un epítipo ampliamente distribuido en la naturaleza (Schabussova et al, 2007).

### Fosforilcolina

La fosforilcolina (PC por sus siglas en inglés) es un pequeño resto similar a un hapteno presente en las secreciones de muchos helmintos (Hewitson et al, 2009). Se reconoce cada vez más como un componente estructural de una amplia variedad de patógenos procariotas y eucariotas que también posee propiedades inmunomoduladoras. Se detectó por primera vez en 1967 en la bacteria *S. pneumoniae*, donde se encontró que estaba asociada al ácido teicoico. Se sabe que, la PC está unida directamente a los residuos de azúcar, generalmente considerados como N- acetilgalactosamina. Desde su descubrimiento en *S. pneumoniae*, PC se ha detectado en una variedad de bacterias gram-positivas. Los organismos eucariotas en los que se ha detectado PC incluyen muchos agentes causantes de enfermedades importantes, como los protozoos, una amplia gama de hongos, trematodo, varios nematodos gastrointestinales y todas las especies de nematodos filariales (Harnett & Harnettb, 1999). Es probable que la PC derivada del parásito no esté asociada con componentes análogos a las bacterianas y fúngicas.

La expresión de PC puede ser perjudicial para el hospedero ya que puede aumentar la persistencia o invasividad de un organismo, o incluso permitirle suprimir o modular las respuestas inmunes del huésped, ya que a concentraciones de 0.2–2 µg/ml, rango en el que se pueden encontrar moléculas que contienen PC en el torrente sanguíneo humano, no causa estimulación policlonal, sino que puede prevenir parcialmente (hasta un 60%) la proliferación de células B asociadas con la ligadura del receptor de antígeno. Esta supresión de la activación de las células B, *in vitro*, podría explicar por qué algunas personas infectadas con nematodos filariales parecen tener respuestas defectuosas de las células B a los antígenos filariales y posiblemente sea consistente con los primeros estudios que muestran que la presencia de PC en una molécula puede inhibir las respuestas de anticuerpos a ella (Harnett & Harnett, 1999).

### Fosfatidiletanolamina

TES-26 es un homólogo de la proteína de unión a fosfatidiletanolamina (PEBP) de mamíferos y pasó a llamarse Tc-PEB-1. Si bien la PEBP de *T. canis* es similar a los homólogos de otras especies en la PE que se une funcionalmente, su estructura difiere notablemente al incluir una extensión N-terminal de 72 aa, que contiene un motivo de seis cisteínas repetido en tándem (Maizels, 2013).

### Lectina tipo C

Las lectinas son proteínas que se unen a los carbohidratos, y las lectinas y galectinas de tipo C del hospedador están involucradas en una variedad de procesos inmunes, como la captación y presentación de antígenos, la adhesión celular, la apoptosis y la polarización de células T. Las lectinas de tipo C (C-TL) son particularmente abundantes en las secreciones de *T. canis*. Las funciones biológicas de los C-TL del parásito no están claras, pero dos C-TL de *T. canis* (TES-32 y TES-70) muestran una mayor homología con proteínas de mamíferos como CD23 (receptor de IgE de baja afinidad) y receptor de manosa en macrófagos. Además, TES-70 es capaz de unir carbohidratos de mamíferos de una manera dependiente de calcio, lo que sugiere un papel en la evasión inmune, por ejemplo, inhibiendo la migración de las células huésped (Hewitson et al, 2009). TES-32 fue reasignado en Tc-CTL-1, esto es homólogo a la proteína de unión a manosa de mamíferos, y los estudios de modelado indicaron que Tc-CTL-1 se une a residuos de manosa (Maizels, 2013). Alternativamente, los parásitos C-TL pueden unirse y enmascarar los carbohidratos del gusano de las células inmunes del huésped. Además, los nematodos C-TL tienen roles no relacionados con la evasión inmune (Hewitson et al, 2009).

### Inhibidores de la proteasa: bloquean las funciones celulares innatas

La respuesta adaptativa a los estímulos del hospedador por la larva encerrada en la cáscara de huevo y la larva migratoria de *T. canis* implica procesos regulados por el desarrollo, como son la secreción de enzimas necesarias para facilitar la

emergencia de las larvas y la invasión de tejidos, respectivamente. Sobre la base de los estudios, está claro que las larvas de *T. canis* secretan proteinasas aspárticas en el líquido del huevo y serina proteinasas en TES (González et al, 2014).

**Tabla 2.** Antígenos comunes que son reconocidos en los productos de secreción y excreción de *Toxocara canis*.

PROTEÍNA	DENOMINACIÓN/PM	LOCALIZACIÓN	FUNCIÓN	PRESENCIA
LECTINA TIPO C	TES 32 <sup>1</sup> / 32 KDa	TES-32 o Tc-CTL-1 es una proteína secretada más prominentemente y muestra una similitud significativa con las lectinas C presentes en las células inmunes de mamíferos en el proceso de respuesta a los patógenos; está localizada en la cutícula del parásito <sup>7</sup> .	Las lectinas son muy similares a las de los mamíferos, y estas son necesarias para la inflamación del tejido, lo que sugiere que <i>T. canis</i> puede interferir con la extravasación de leucocitos en sitios infectados <sup>7</sup> .	Tc-CTL-1 parece estar bien conservado dentro del género <i>Toxocara</i> ; el AcMo anti-Tc-CTL-1 reacciona con proteínas tanto en <i>Toxocara cati</i> (como en <i>Toxocara vitulorum</i> ; aunque con diferentes pesos moleculares. Existe una reactividad cruzada significativa de Tc-CTL-1 con anticuerpos generados contra el ascarido <i>Baylisascaris procyonis</i> <sup>7</sup> .
	TES 70 <sup>1,2</sup> /70 kDa	TES-70 es otra lectina de tipo C, conocida como Tc-CTL-4, que se ha demostrado que se une a las células caninas <i>in vitro</i> . Aunque el ligando de los mamíferos aún no se ha identificado, esta es la primera instancia de un producto TES que se dirige directamente a los receptores del huésped <sup>7</sup> .		Los anticuerpos monoclonales contra Tc-CTL-4 también reaccionan con productos en ES de otras especies de <i>Toxocara</i> , lo que indica que la secreción de lectinas de tipo C podría ser un sello distintivo compartido de este género <sup>7</sup> .
MUCINAS	TES 120 <sup>1</sup> / 120 kDa MUC 1-5 <sup>2</sup> /Se demostró que MUC-1, -2 y -3 son mucinas secretadas con masas reales de 39.7, 47.8 y 45.0 kDa	Sintetizadas en grandes estructuras glandulares dentro de la larva y secretadas para formar una capa superficial alrededor del parásito <sup>5</sup> .	Elaboración de una capa superficial especializada rica en mucina; la cual se une libremente a la epicutícula del parásito de una manera que permite un escape rápido cuando los anticuerpos y las células del hospedero se adhieren, lo que resulta en una reacción inflamatoria alrededor de un foco recientemente desocupado <sup>3,7</sup> .	
PROTEÍNAS DE UNIÓN A FOSFATIDILETANOL AMINA	TES 26 / 26 kDa	La ubicación preferencial de PE en la valva citoplasmática de las membranas plasmáticas, es que una PEBP podría asociarse asimétricamente con proteínas unidas a la membrana <sup>8</sup> .	Las PEBP pueden estar involucradas en la segregación de lípidos en compartimentos biológicamente distintos, ya que la superficie de las larvas de <i>T. canis</i> está compuesta por dominios lipídicos discontinuos no difusos <sup>8</sup> .	Proteína homóloga asociada con la superficie (cutícula) de gusanos adultos de <i>O. volvulus</i> <sup>8</sup> y <i>B. malayi</i> <sup>10</sup>
PROTEASAS		Emanan del intestino de gusanos adultos, mejor llamadas enzimas digestivas <sup>10</sup> .	Penetración de las barreras tisulares, digestión extracelular de las proteínas del huésped, así como la alimentación de los nematodos <sup>4,2</sup> .	
AGENTE ALERGÉNICO	TES 400/Los NPA se sintetizan como polipéptidos grandes que posteriormente se cortan proteolíticamente en unidades de polipéptidos de 15 kDa <sup>6</sup> .	Glucoproteína resistente a la escisión trípica o péptica pero sensible a la proteólisis estafilocócica V8 y también se detecta en TES, pero no en la superficie L2, lo que aumenta la posibilidad de que sea un complejo extracelular de otros TES <sup>2</sup> .		
FOSFORICOLINA		Componente de ciertas glucoproteínas secretadas activamente por los nematodos filariales <sup>9</sup> .	Los antígenos filariales que contienen PC podrían contribuir a la anergia de tipo T helper 1 (Th1) específica de antígeno observada en algunos pacientes con filariasis <sup>9</sup> . Esto se ha correlacionado con la producción de IL-10 y, de hecho, tales individuos generalmente muestran un fenotipo Th2 de respuesta <sup>9</sup> .	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus spp</i> <i>Clostridium spp</i> <i>Lactococcus spp</i> <i>Bacillus spp.</i> y <i>Leishmania major</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> Hongos Nematodos gastrointestinales Nematodos filariales <sup>9</sup>

Maizels et al, 2000<sup>1</sup>; González et al, 2014<sup>2</sup>; Loukas et al, 2000<sup>3</sup>; Chen et al, 2018<sup>4</sup>; Schabussova et al, 2007<sup>5</sup>; Yahiro et al, 1998<sup>6</sup>; Maizels, 2013<sup>7</sup>; Gems et al, 1995<sup>8</sup>; Harnett & Harnett, 1999<sup>9</sup>; Hewitson et al, 2009<sup>10</sup>

## Pruebas diagnósticas

En humanos, las lesiones causadas por las larvas de *T. canis*, se pueden detectar con varias técnicas de imagen como ultrasonido, tomografía computarizada e imágenes de resonancia magnética (Strube et al, 2013). Aunado a ello se requiere de los estudios histopatológicos, donde por medio de una biopsia se extrae material de los diferentes órganos comprometidos, esto debido a que en el humano las larvas no llegan a la etapa adulta (Robertson et al, 1988) y ni los huevos ni las larvas se eliminan en las heces del humano (Theodoridis et al, 2011), en lugar de ello las larvas quedan en estado hipobiótico en los tejidos, por lo tanto, un examen de muestras fecales no es útil; por ello el examen histopatológico posterior a una técnica de tinción especial conduce a un diagnóstico definitivo. Sin embargo, es una técnica muy invasiva, porque rara vez las larvas están disponibles en el tejido y pueden requerirse múltiples secciones, por ello es de muy poca aplicabilidad en la mayoría de los casos (Robertson et al, 1988; Kaminsky, et al 2014). Así, el acercamiento al diagnóstico se basa en la detección de anticuerpos mediante pruebas serológicas y la mayoría de éstas se basan en ensayos por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), donde se emplean Ag ES de larvas L2/L3 de *T. canis* que tienen diferentes especificidades (90-92%) y sensibilidades (75-86%) según la calidad del antígeno utilizado (Archelli & Kozubsky, 2008); o menos común, usando proteínas recombinantes (sensibilidad del 99% y especificidad 94%) (Morales et al, 2019).

Antes del uso de Ag ES como antígeno de diagnóstico, la mayoría de las encuestas de infección humana se basaban en pruebas que usaban antígenos somáticos solubles en agua derivados de huevos embrionados, larvas o adultos de *T. canis*. Muchos de estos antígenos somáticos carecían de sensibilidad y poseían un alto grado de reactividad cruzada con otros antígenos ascaridos. Pero a mediados de la década de 1970 Savigny introdujo la técnica de cultivo *in vitro* de larvas de segunda etapa de *T. canis* que dejaba incubando durante períodos prolongados y posterior era la recolección de Ag ES, ya que este antígeno proporciona una ventaja significativa sobre los antígenos somáticos de gusanos, y es que, al liberarse de las larvas vivas, es probable que ingresen a la sangre y potencialmente proporcionen un marcador cuantitativo y cualitativo para las infecciones activas (Kenne, 1987), la cual creó un gran avance en el diagnóstico, y mejoró considerablemente la especificidad, sensibilidad y reproducibilidad en los métodos de serodiagnóstico (Thomas et al, 2016).

Como se mencionó anteriormente, en presencia del antígeno TES las células B sintetizan anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE (Theodoridis et al, 2011). El serodiagnóstico por ELISA se basa en la detección de anticuerpos IgG e IgM específicos de antígeno TES. Donde los anticuerpos IgM específicos de antígeno TES constituyen un marcador clásico para identificar la *etapa aguda*, no obstante, los anticuerpos IgM se pueden encontrar a lo largo de la carrera de infección, lo que ocasiona inconvenientes para diferenciar entre infecciones *agudas* y *crónicas*. Como los síntomas clínicamente significativos aparecen en la *fase crónica* de la enfermedad, no sería de utilidad la detección de anticuerpos IgM, aunque existen pocos reportes del uso de este tipo de anticuerpo. Al contrario, los anticuerpos IgG contra el parásito permanecen a un título casi constante durante un largo periodo en el paciente, aun después de haber finalizado el tratamiento antihelmíntico (Roldán et al, 2010) persisten después de la primer infección, y resulta difícil diferenciar la infección *aguda* de la *pasada*, por lo que los resultados serológicos deben ser evaluados en el contexto clínico epidemiológico del paciente, o bien hacer un ELISA-Avidez-IgG que emplea urea como agente disociante de los complejos antígeno-anticuerpos. Los anticuerpos de baja avidéz se relacionan con infecciones recientes, mientras que los de alta avidéz con infecciones *pasadas* o *crónicas* (Archelli & Kozubsky, 2008).

La medición de anticuerpos IgG específicos en el curso de la infección, y medición paralela de otros marcadores, como IgE total y eosinofilia, puede ser más informativo, así como, la identificación de las subclases de anticuerpos IgG podría mejorar el serodiagnóstico de la infección por *T. canis*. Si bien la detección de anticuerpos IgG2 específicos puede aumentar la sensibilidad, los anticuerpos IgG3 e IgG4 ofrecen los mejores resultados de especificidad. En cuanto a la respuesta humoral de ratones infectados, también se aplica ELISA basado en la detección de anticuerpos IgM, IgG, IgG1 e IgG2a específicos de antígeno TES (Muñoz & Alba, 2010).

Si bien las pruebas serológicas siguen siendo el enfoque menos invasivo y más sensible para diagnosticar la toxocariasis, exhiben deficiencias importantes que aún no se han resuelto. Una de ellas es la falta de especificidad debido a la reactividad cruzada con otros antígenos parásitos como *Ascaris lumbricoides*. El inmunodiagnóstico ha mejorado significativamente desde el desarrollo de una transferencia Western Blot (WB) y se recomienda para confirmar el resultado obtenido por ELISA para la detección de IgG con especificidad para *T. canis* (Morales et al, 2019). Esto se debe a que los componentes de alto peso molecular (200, 147, 132 y 66 kDa) de los antígenos TES contienen epítomos antigénicos de reacción cruzada con otros helmintos. Este problema se puede resolver con el uso de la prueba de WB que de alguna manera fracciona o divide los componentes de los antígenos TES de acuerdo con su PM, y fácilmente pueden identificarse que los componentes de bajo

peso molecular (35, 30, 28 y 24 kDa) resultan ser más específicos para confirmar el serodiagnóstico de la toxocarosis (Roldán et al, 2010).

### Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales (AcMo) son anticuerpos altamente específicos producidos a partir de células de hibridoma. Estas células de hibridoma se crean aislando precursores de células plasmáticas, que luego se fusionan con células inmortales. Las células de hibridoma se pueden clonar y expandir en células individuales como clones individuales que secretan solo un tipo de anticuerpo, un anticuerpo monoclonal. La alta especificidad de un anticuerpo monoclonal es una ventaja significativa, particularmente en aplicaciones terapéuticas, debido a que la mayoría de los tumores de origen celular, es monoclonal y, por tanto, produce anticuerpos de una sola especificidad (Abbas et al, 2015; Amersham Pharmacia Biotech, S.F).

Los anticuerpos son capaces de reconocer de forma específica una amplia variedad de antígenos con afinidades variables. Todas las características del reconocimiento del antígeno reflejan las propiedades de las regiones V del anticuerpo, además los anticuerpos pueden ser muy específicos de los antígenos y distinguir entre pequeñas diferencias en la estructura química. La especificidad exquisita de los anticuerpos se aplica al reconocimiento de todas las clases de moléculas. Por ejemplo, los anticuerpos pueden distinguir entre dos determinantes proteínicos lineales que se diferencian en un solo aminoácido que tenga poco efecto en la estructura secundaria. Este grado alto de especificidad es necesario para que los anticuerpos generados en respuesta a los antígenos de un microbio no reaccionen habitualmente con moléculas propias con una estructura parecida ni con antígenos de otros microbios. Sin embargo, algunos anticuerpos producidos contra un antígeno pueden unirse a un antígeno diferente, pero con una estructura relacionada. A esto se le denomina reacción cruzada (Abbas et al, 2015). La reactividad cruzada mide el grado en que diferentes antígenos parecen similares al sistema inmunológico. Los determinantes moleculares de especificidad y reactividad cruzada definen la naturaleza de la variación antigénica y los procesos selectivos que dan forma a la distribución de variantes en las poblaciones (Steven, 2002).

Los AcMo *anti-Toxocara* están sujetos a compromiso al reaccionar de forma cruzada con antígenos que varían, desde sustancias del grupo sanguíneo hasta patógenos estrechamente relacionados. La serología de las infecciones por nematodos es particularmente propensa a dicha interferencia (Kenne, 1987). Por ello, un resultado falso positivo puede darse en pacientes con ascariosis, estrongiloidosis, triquinelosis, fasciolosis y otras helmintosis relacionadas. Un aspecto por considerar es cuando el paciente se encuentre coinfectado con otros helmintos, problema que puede ser resuelto indicando al paciente un análisis coproparasitológico seriado (Roldán et al, 2010).

## Objetivos

### Objetivo General:

Caracterizar los anticuerpos monoclonales producidos contra productos de excreción secreción de *Toxocara canis* (anti-PEST).

### Objetivos Específicos:

- Propagar dos líneas celulares 1E4 y 5E4, para la obtención de anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -*Toxocara canis*.
- Cuantificar la concentración de los diferentes antígenos de otros parásitos que se utilizaran para reacciones cruzadas.
- Determinar reacciones cruzadas mediante ELISA indirecto.
- Purificar anticuerpos monoclonales.
- Evaluar la purificación mediante electroforesis SDS-PAGE.
- Comprobar por medio de Western Blot la reactividad cruzada presentada por ELISA indirecto.

## Justificación

Toxocariasis causada por *Toxocara canis* es una enfermedad zoonótica que afecta especialmente en países tropicales y en desarrollo. Los niños son más vulnerables a la infección debido al contacto directo con el suelo durante la recreación y la geofagia, se considera endémica a nivel mundial, tanto en países desarrollados, subdesarrollados y en vía de desarrollo (Delgado & Rodríguez, 2009; Rojas et al, 2016). En México no es una enfermedad de vigilancia convencional o notificación inmediata y en 2015 se estimó una seroprevalencia de la enfermedad del 12.45 %. No obstante, en la actualidad una limitante

de las pruebas por serodiagnóstico es la significativa reactividad cruzada con otros helmintos, como *Ascaris lumbricoides*, particularmente en áreas endémicas (Chen et al, 2018). Por ello, es necesario de un método de diagnóstico más específico para este parásito.

## Materiales y Métodos

### 1. Mantenimiento y propagación de líneas celulares

- El manejo de los cultivos celulares se realiza en campana de flujo laminar tipo II y se mantienen a 37°C en una atmósfera húmeda con una mezcla de 95% aire y 5% de CO<sub>2</sub>.
- Las células híbridas (5E4 y 1E4) se cultivan en medio DMEN enriquecido con suero fetal bovino al 10% v/v.
- Los cultivos se revisan diariamente en el microscopio invertido, vigilando la morfología celular, así como las posibles fuentes de contaminación bacteriana y fúngica.
- Se realizan cambios de medio de cultivo cuando éste vire de anaranjado a amarillo, lo que indica un cambio en el pH por acidificación.
- Cuando los cultivos se encuentren confluentes resebrar las células en cajas nuevas o congelar a -70° C o -196°C en nitrógeno líquido.

### 2. Procedimiento para crio-preservación de líneas celulares

- Cada vez que se trabaja con la campana de flujo laminar se realiza descontaminación con luz UV, posterior a los 10 min, se descontamina con etanol al 75 % de atrás hacia delante.
- Las células se despegan y las botellas se ponen boca arriba.
- Se extraen 25 mL de cada botella.
- Se centrifugan el extracto crudo a 2000 rpm por 5 min.
- Se recupera el sobrenadante de cada tubo por decantación en otro tubo (previamente rotulado).
- El botón que queda al fondo del tubo se re-suspende con 1 o 2 mL de SFB y DMSO (disolución criopreservadora) y se guarda un mL en un criotubo.
- Posteriormente se almacenan a:
  - El botón de células a -70°C.
  - Sobrenadante a -20°C.

### 3. Descongelación de líneas celulares

- Atemperar agua y medio DMEN suplementado al 10% con SFB a 37° C.
- Limpieza (procedimiento anterior).
- Colocar dentro los reactivos, utensilios y muestras que se van a utilizar.
- Las células híbridas se atemperan en el agua, previamente caliente y una vez fundido el contenido rápidamente se decanta en un tubo cónico de 15 mL que contiene 7 mL de medio DMEN suplementado al 10% con SFB, el cual se centrifuga a 2000 rpm por 5 min.
- El precipitado de células se suspende en 7 mL de medio nuevo y se coloca en una caja pequeña.
- Se incuba a 37° C.

### 4. Pase celular y limpieza

- La limpieza o el pase de las células se realiza cada vez que se observe confluencia en la caja del cultivo, se da un pequeño golpe en la caja donde se presente confluencia celular. \*
- La caja se pone en posición vertical para que las células precipiten al fondo de la botella y posteriormente se recupera todo o la mitad del contenido, este contenido es puesto en tubo cónicos y se centrifuga 2500 rpm por 5 min.
- Las cajas se recompensan con medio nuevo, si se trata de la limpieza de las células y en caso de un pase se coloca 1 mL de la caja con confluencia celular y la cantidad de medio depende del tamaño de la caja.
- Se ponen a incubar a 37° C y se monitorizan cada 2 días.

\* Si el crecimiento no es muy abundante y el medio ya cambio de pH, no es necesario despegar las células, sólo se extrae el medio y se cambia por medio nuevo.

### 5. Cuantificación de proteínas antígeno por el método de Bradford

- Se preparó el stock con 10 mg en un mL de PBS.

- De éste se pasa a uno más pequeño para que sea de 2mg/mL, es decir, en un tubo se pasan 200µL del primer stock y se afora a 1 mL con 800 µL de PBS.
- Se rotulan los tubos del 10µg/mL a 100µg/mL.
- En los 10 tubos se ponen las siguientes cantidades de reactivos (Tabla 3):

**Tabla 3.** Curva de calibración de albumina bovina de Bradford (Medina et al, 2019).

Tubo	Proteína (2 mg/mL)	PBS	Concentración
0	0 µL	1000 µL	0 µg/mL
1	5 µL	995 µL	10 µg/mL
2	10 µL	990 µL	20 µg/mL
3	15 µL	985 µL	30 µg/mL
4	20 µL	980 µL	40 µg/mL
5	25 µL	975 µL	50 µg/mL
6	30 µL	970 µL	60 µg/mL
7	35 µL	965 µL	70 µg/mL
8	40 µL	960 µL	80 µg/mL
9	45 µL	955 µL	90 µg/mL
10	50 µL	950 µL	100 µg/mL

- Los tubos se almacenan en congelador a -20°C, si no son serán utilizados.
- Se hace la curva en una microplaca y se colocan 40 µL de cada una de las concentraciones considerando un blanco. Posteriormente se añaden 160 µL de reactivo de Bradford, se deja reaccionar unos cuantos minutos y se lee a 595 nm en un lector de ELISA (Sunrise™) con el complemento de software de control universal de lectores y análisis de datos Magellan™ de Tecan.

## 6. Clase y subclase por ELISA tipo indirecto

- La unión de los antígenos al soporte sólido se hizo por adsorción no-covalente en una placa maxisorp, ésta es sensibilizada con antígeno de *T. canis* (sobrenadante de cultivo o purificado) en amortiguador de carbonatos 1M, pH 9.6 a una concentración de 5 µg/mL y en un pozo aparte se colocan 100µL de control de conjugados, se deja reaccionando con los pozos de poliestireno durante toda la noche a 4 °C.
- Al día contiguo los pocillos son lavados con PBS-Tween 0.05% (se hacen 3 lavados de 5 minutos cada uno) y posteriormente se bloquea con leche descremada al 0.5 % en PBS-Tween 0.05%, durante 30 minutos a 37° C.
- El sobrenadante extraído (AcMo  $\alpha$ -*T. canis*) de los hibridomas 1E4 y 5E4, se adiciona 100µL directos en los pozos correspondientes, la placa se deja reaccionar durante toda la noche a 4 °C.
- Se añadieron inmunoglobulinas de carnero comerciales, anti-ratón subclase: IgM, IgG1, IgG (H+L), IgG2a, IgG2b, IgG3, marcadas con peroxidasa de rábano (Sigma Chemical Co.) a una dilución de 1:1000 en PBS-T (Para elegir la concentración adecuada se realiza una titulación de los anticuerpos secundarios). La incubación se llevó a cabo durante 1h a 37 °C.
- Para el revelado de la placa, se prepara una solución consistente en 4 mg de ortofenilendiamina, diluidos en 10 mL de solución tampón citratos (5 mL ácido cítrico + 5 mL citrato de sodio) más 4µL de peróxido de hidrógeno la cual fue dispensada a razón de 100 µL por pocillo. Seguidamente, la placa se mantiene a temperatura ambiente en lugar oscuro por un período de 10 min.
- La reacción fue detenida por adición de ácido sulfúrico al 2 N y la absorbancia fue medida a 492 nm.

## 7. Purificación de anticuerpo monoclonal

### Equilibración

Antes de insertar el adaptador a la columna (HiTrap IgM Purification HP “columna de 1 mL preempaquetada con Sepharose High Performance”), se agrega agua para evitar la formación de burbujas.

Se pasan 10 mL de H<sub>2</sub>O (sólo cuando la columna sea nueva o después de mucho tiempo de guardado).

1. Pasar a través de la columna 5 mL amortiguador de unión (Fosfatos de sodio 20 mM con (NH<sub>4</sub>) SO<sub>4</sub>).
2. Pasar a través de la columna 5 mL amortiguador de elución (Fosfatos de sodio 20 Mm pH 7.5).
3. Pasar a través de la columna 5 mL amortiguador de regeneración (Fosfatos de sodio 20 Mm pH 7.5 con Isopropanol al 30 %).

4. Pasar a través de la columna 5 mL amortiguador de unión.

#### Acondicionamiento de la muestra

El sobrenadante se sulfata con  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  a 8 mM, posteriormente la muestra se filtra con membranas de nitrocelulosa con tamaño de poro 45  $\mu\text{m}$ .

#### Paso por la columna

1. Pasar 10 veces el volumen de la columna con amortiguador de unión.
2. Pasar de muestra  $\frac{1}{2}$  mL\*min (2 repeticiones).
3. La columna se deja bien tapada y se refrigera a  $-4^\circ\text{C}$  durante toda la noche.
4. Al día siguiente se elimina lo que no se unió con amortiguador de unión y hacen pasar 15 veces el volumen de la columna. Desde el inicio de elución se toman fracciones de 1 mL o 25 gotas.
5. Cada una de las fracciones se lee a 280 nm, el procedimiento del numeral anterior se repite hasta que las densidades ópticas lleguen a aproximarse a 0.
6. Los anticuerpos que se unieron sefariosa son eluidos con 12 veces el volumen de la columna con amortiguador de elución.
7. Se toman fracciones de 1 mL o 25 gotas desde el comienzo de la elución y se leen a 280 nm, repetir el procedimiento hasta que las densidades ópticas sean cercanas a 0. En este punto se seleccionan las fracciones con mayor densidad óptica no menores a 0.100 mg/mL
8. Se pasa el amortiguador de regeneración 7 veces el volumen de la columna.
9. La columna se recalibra pasando amortiguador de unión 7 veces el volumen de la columna.

#### Diálisis

1. Los pozos con mayor densidad óptica se transfieren a una membrana de celulosa asegurada por ambos lados para evitar la fuga del líquido.
2. En un matraz Erlenmeyer se coloca PBS filtrado y un magneto, posteriormente se introduce la membrana con los anticuerpos.
3. Se realizan cambios de PBS filtrado tres veces por cada 20 min.
4. El dializado se recupera en tubos Eppendorf.
5. Se determina la pureza de los anticuerpos mediante SDS-PAGE (Figura 5).

#### 8. Cuantificación de anticuerpos por EPOCH (BioTek)

La cuantificación de proteínas se realiza en el espectrofotómetro para Microplacas Epoch™ con óptica basada en monocromador ofrece selección de longitudes de onda sin necesidad de usar filtros de interferencia, para mediciones en el UV-Visible, en una variedad de formatos de microplacas y permite trabajar con volúmenes de muestra pequeños de 4  $\mu\text{L}$ , para la cuantificación directa de proteínas con la microplaca Take3. El Epoch es controlado a través del Software Gen5.

#### 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

- Lavar las placas de vidrio con agua y después con alcohol al 70 % y dejar secar.
- Montar sobre el soporte de electroforesis la esponja (evitar la salida de líquidos), después el juego de placas de vidrio (1mm o 0.75 mm) y por último separadores (1mm o 0.75 mm).
- Se preparan el gel separador al 10 % de acrilamida y el gel concentrador al 5 % (Anexo 1).
- Una vez preparada la mezcla para el gel separador, se vierte la mezcla entre las placas de vidrio dejando un marco de 3 cm aproximadamente del borde superior, se dejan pasar unos segundos y se agrega un poco de agua u etanol al 70%, este se retira hasta que polimerice, es importante que vertido se haga lento, ya que pueden formarse burbujas.
- Posteriormente, se agrega el gel concentrador lentamente por las paredes de las placas sin formar burbujas y rápidamente se introduce el peine evitando la formación de burbujas, se deja polimerizar y una vez que se vaya montar las muestras en los carriles, se retira el peine con mucho cuidado introduciendo agua destilada en el interior de cada uno de ellos.
- Se ponen las placas en el electrodo y se coloca dentro de la cámara de electroforesis (Miniprotean II – BIO-RAD), llenando la cámara interior con amortiguador de electroforesis (Tris-Glicina). Verificar la ausencia de burbujas en el espacio que se genera entre los vidrios en la parte inferior, entre el gel y la solución de electroforesis.

### Preparación de la muestra y corrimiento:

- Preparar las muestras mezclándolas 1:1 v/v con el amortiguador de muestra. Si se requieren condiciones reductoras añadir 2-β-mercaptoetanol al amortiguador de muestra a una concentración final del 10%.
- Hervir las muestras preparadas 5 min en baño María.
- Colocar las muestras en su carril correspondiente, incluyendo en cada gel un carril con estándar de pesos moleculares preteñidos.
- Llenar la cámara superior con amortiguador de electroforesis (Tris-glicina) recién preparado.
- Conectar la cámara a la fuente de poder y ajustar la corriente a 120 volts constantes. Mantener la electroforesis hasta que el frente iónico esté a medio centímetro del final de la placa.
- Al terminar la electroforesis sacar el gel.

### Tinción de proteínas en el gel:

- Se coloca el gel en un recipiente que contenga azul de Coomassie, procurar que el gel quede cubierto completamente. Incubar toda la noche a 4°C ó 2 h a temperatura ambiente.
- Eliminar el colorante (puede ser usado varias veces si se filtra a través carbón activado en papel Whatman No. 1) y agregar la solución decolorante.
- Hacer los cambios necesarios de decolorantes hasta lograr la nitidez adecuada de las bandas y la transparencia del gel.

## 10. Electrotransferencia Western Blot

El gel se prepara como se indica en el procedimiento anterior en cada carril se coloca los diferentes antígenos de concentración conocida, pero se omite la decoloración.

### Preparación de la cámara y transferencia:

- Colocar fibras Scotch\* y papeles filtros Whatman\* (grosor 0.16 mm) en un recipiente con suficiente amortiguador de transferencia 30 min antes de transferir.
- Cortar la membrana de nitrocelulosa (NC) de acuerdo al tamaño del gel (utilizando guantes) y colocarla en otro recipiente que contenga amortiguador de transferencia.
- Colocar dos fibras Scotch sobre la base de color negro del cassette de transferencia luego 2 papel filtro teniendo cuidado de que no queden burbujas atrapadas entre los papeles, después colocar el gel y sobre este la membrana de NC; eliminar las burbujas.
- Con un lápiz marcar el frente de electroforesis del gel, sobre el papel de NC y señalar el carril número uno de acuerdo a la colocación de las muestras, colocar otros dos papeles filtros sobre la NC y otras dos fibras. Cerrar el cassette e insertarlo en el contenedor en orden de acuerdo al color del electrodo de transferencia.
- Llenar la cámara con el amortiguador de transferencia, tapar y conectar los electrodos de tal manera que el ánodo (-) quede del lado del gel y el cátodo (+) del lado de la NC; conectar a la fuente de poder y transferir durante una hora a 100 volts, cuidando que la temperatura del líquido no se eleve a más de 60°C.
- Al terminar la transferencia tomar la membrana de NC con guantes y colocarla en un recipiente con rojo de Ponceau, para verificar que las proteínas fueron transferidas a la NC; esto se observa con la aparición de bandas de color rojo, momento en el cual debe quitarse el exceso de colorante y lavar con agua destilada, aproximadamente de 4 a 5 veces.
- Cortar el pedazo de membrana donde están los marcadores de PM, dejarla secar y guardarla para su uso posterior.

## 11. Especificidad del anticuerpo monoclonal (reacciones cruzadas)

- Los carriles son cortados y luego son colocados en placas con canales.
- Cada canal se bloquea con leche descremada al 5 % en PBS-Tween 20 al 0.05% y se deja incubando durante 30 min a 37 °C.
- Posteriormente se agrega 1 mL del anticuerpo monoclonal a una concentración [10µL/mL], con el que se está trabajando y se deja a 4 °C durante toda la noche.
- Al día siguiente se realizan lavados con en PBS-Tween 20 al 0.05% (3 veces por 5 min cada uno y en movimiento constante).
- Luego se agregan 1 mL del anticuerpo secundario (conjugado anti-ratón a la dilución de 1:2000) y se deja reaccionando a 37 ° C por 1 h y 30 min.

- Se realizan lavados, como se indican en el punto anterior.
- Como último paso se diluyeron 4 mg de ortofenilendiamina en 10 mL de solución tampón citrato 4 µg de peróxido de hidrógeno y se agrega un 1 mL de la solución a cada uno de los carriles, hasta que se aprecien las bandas.
- Se agrega agua destilada para parar la reacción o se decanta la disolución y se agrega agua destilada a los carriles.

## Resultados y discusión

La recepción de las dos líneas celulares 5E4 y 1E4 productoras de anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -*Toxocara canis*, se realizó el día 06/05/2019, ambas son productoras de anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -PEST, dichas células se observaron cada día a 10 X y 40 X, se les proporcionó medio de cultivo fresco DMEN suplementado con suero fetal bovino al 10 % cada vez que fuese necesario (Figura 2 y 3) y las larvas de *Toxocara canis* estadio L2 se alimentaron con medio RPMI libre de suero (Figura 4).

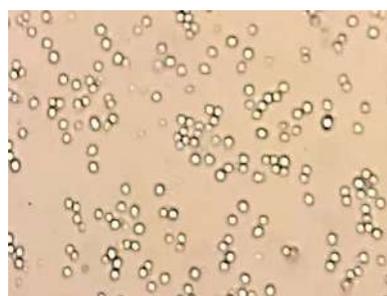


Figura 2. Células 5E4.

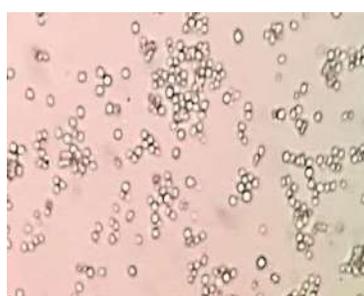


Figura 3. Células 1E4.

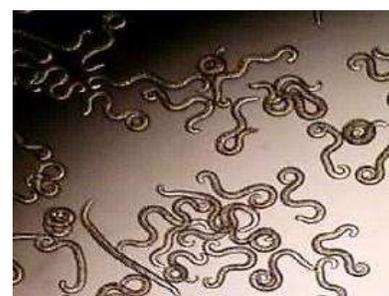


Figura 4. Refrigerancia de larvas en estadio L2 de *T. canis*.

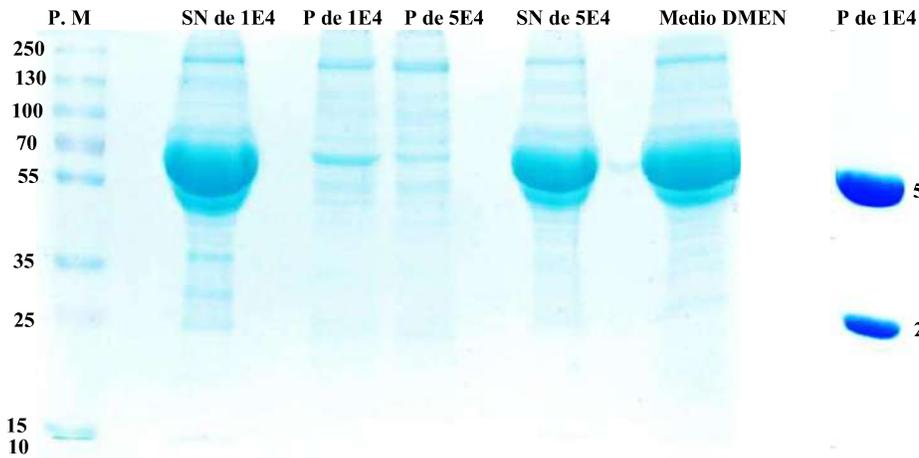
Una vez de haber propagado y dar mantenimiento a los cultivos celulares, se utilizan los sobrenadantes de hidromas 1E4 (INP-1E4G4C2) y 5E4, las cuales estaban previamente asiladas por Rodríguez y colaboradores en 2017 (artículo referenciado). Dichos sobrenadantes se utilizan para el ensayo ELISA indirecto, el cual será para conocer la clase o subclase del anticuerpo.

Tabla 4. ELISA indirecto para verificar clase o subclase de anticuerpo monoclonal del sobrenadante anti-*Toxocara canis*.

Variables		Clase o subclase (anticuerpo secundario)						
Tamiz	Anticuerpo primario	IgM	IgG	IgG (H+L)	IgG2a	IgG2b	IgG3	PBS
Ag PES de <i>T. canis</i> (5µg/mL)	Extracto crudo de anticuerpos directo (1E4)	1.61	2.264	2.373	0.076	0.082	0.067	0.047
	Extracto crudo de anticuerpos directo (5E4)	3.182	0.138	2.382	0.096	0.057	0.056	0.049
	Título del Control de conjugados (CC)	1.894	3.654	1.64	1.41	2.382	0.391	0.046
Extracto crudo de <i>T. canis</i> (5µg/mL)	Extracto crudo de anticuerpos directo (1E4)	1.038	0.737	1.583	0.087	0.091	0.07	0.047
	Extracto crudo de anticuerpos directo (5E4)	2.227	0.107	2.846	0.168	0.088	0.076	0.047
	Título del Control de conjugados (CC)	1.894	3.654	1.64	1.41	2.382	0.391	0.046

Se realizó un ELISA indirecto donde la variante fue la pureza del antígeno con la que se tapizó la placa Ag PES de *T. canis* (5µg/mL) contra el Extracto crudo de *T. canis* (5µg/mL) previamente cuantificados por el método de Bradford, es evidente que cuando se utiliza antígeno puro hay más interacción con el anticuerpo porque habrá menos impedimento sobre el epítipo, ya que el extracto crudo no sólo contiene las proteínas de interés sino también incluyen todas aquellas con las se suplementa el medio para el cultivo celular. Por lo tanto, la colorimetría observable y las absorbancias indican que los hibridomas 5E4 producen inmunoglobulinas del isotipo M; y, al contrario, a lo obtenido en experimentos anteriores por Rodríguez et al, 2017, los hibridomas 1E4 pueden producir del isotipo M, ya que no sólo presentan títulos en IgM sino también en IgG como se muestra en la Tabla 4.

Posterior a ello, se procede a purificar los extractos crudos de los anticuerpos de los hibridomas (1E4 y 5E4), la cual se realiza por medio de cromatografía tiofílica con columna HiTrap IgM Purification HP apartado 7, la purificación se corrobora por electroforesis SDS-PAGE (Figura 5); como se muestra en la Tabla 4, el extracto crudo de los hibridomas 1E4 también presentan títulos altos cuando se utiliza el conjugado secundario IgG, por lo tanto, también se cuenta con el anticuerpo purificado por afinidad a proteína A (Metodología e imagen se encuentra en el documento de García, 2018).



**Figura 5.** Electroforesis SDS-PAGE para evaluar purificación de anticuerpos murinos  $\alpha$ -*T. canis*. En la parte de izquierda se encuentra el marcador de peso molecular (kDa) del 250 al 10, el 2<sup>do</sup> y 5<sup>to</sup> carril se encuentra el sobrenadante sin purificar de cada hibridoma 1E4 y 5E4 respectivamente, y en el 3<sup>er</sup> y 4<sup>to</sup> carril se colocaron los sobrenadantes purificados por cromatografía tiofílica de cada clona celular 1E4 y 5E4 respectivamente; además se colocó el medio DMEN como un blanco de referencia y en la parte derecha de la electroforesis se visualiza el corrimiento del anticuerpo purificado por proteína A de la célula 1E4 (Metodología e imagen se encuentra en el documento de García, 2018).

El corrimiento de las bandas se analizó a través del software Gelanalyzer en <http://www.gelanalyzer.com/>, donde por cada carril se obtienen los espectros correspondientes y de ahí se toman los picos más prominentes para calcular los pesos moleculares (Anexo 2; Tabla 10).

**Tabla 5.** Pesos moleculares de las bandas que se encontraron en la electroforesis SDS-PAGE.

Bandas	Carril 2		Carril 3		Carril 4		Carril 5		Carril 6	
	RF	PM	RF	PM	RF	PM	RF	PM	RF	PM
1	0.073	154.4	0.086	148.73	0.004	188.322	0.075	153.515	2.193	156
2	0.123	133.706	0.158	120.893	0.092	149.184	0.13	131.039	2.107	128
3	0.18	113.475	0.198	107.75	0.158	120.893	0.191	109.939	2.060	114.82
4	0.246	93.843	0.264	89.105	0.207	104.99	0.255	91.443	1.976	94.624
5	0.367	66.245	0.316	76.72	0.268	88.085	0.354	68.77	1.840	69.183
6	0.42	56.872	0.376	64.551	0.31	78.055	0.409	58.70	1.771	59.020
7	0.549	39.233	0.415	57.597	0.38	63.812				
8	0.64	30.193	0.587	35.168	0.42	56.872				
9	0.714	24.401	0.727	23.504	0.468	49.534				
10					0.499	45.305				
11					0.589	34.966				
12					0.701	25.331				
13					0.736	22.903				

Las Inmunoglobulinas M corridas en SDS-PAGE bajo condiciones de reducción presentan una serie de bandas, se tomaron aquellas cuya intensidad es más prominente; para el anticuerpo IgM 1E4 sin purificar se observan bandas desde 154.4, 93.853, 66.245, 56.872 y 39.233 kDa, y al contrario cuando se purificaron se obtienen desde 148.73, 89.105, 76.72, 64.551 y 57.597 kDa; para los anticuerpos IgM 5E4 sin purificar son bandas de 153.515, 91.443, 68.77 y 58.70, muy similares a las que presentó en la purificación 149.184, 88.085, 78.055, 63.812 kDa. Sin embargo, en otros trabajos bajo las mismas condiciones los anticuerpos IgM son representados por dos bandas, la primera con un peso aproximado de 90 kDa y la segunda con un peso aproximado de 70 kDa. Estos resultados podrían estar determinados por la presencia de dos tipos distintos de cadena pesada para la IgM (Montoya et al, 2007). El suero fetal bovino contiene un gran número de factores macromoleculares y nutricionales esenciales para el crecimiento celular, uno de ellos es la albúmina sérica bovina (componente más abundante), por ello en el gel pueden encontrarse un corrimiento de bandas pertenecientes a la albúmina que van desde 200, 116, 97 y 66 kDa según Torres et al, 2012; aunado a ello contiene pequeñas moléculas como aminoácidos, azúcares, lípidos y hormonas, que son de gran importancia para el mantenimiento y crecimiento de células en cultivo; los pesos moleculares son muy similares a los resultados expresados en el (Tabla 5) carril 5. Debido a la obtención

de varias bandas en los anticuerpos purificados podríamos sospechar que aquellas bandas que no se aproximen a los pesos de 90 y 70 kDa, pueden pertenecer a la albumina. Es por ello, que a través del proceso se toman alícuotas de 1 ml o 20 gotas para ser examinadas por espectroscopia Gráfico 1.

Por otro lado, las inmunoglobulinas G en las mismas condiciones muestran a la cadena pesada con un peso aproximado a 50 kDa y a la cadena ligera en 25 kDa, mismos resultados que se expresan en el escrito de Ching et al, 2010, cuando someten al anticuerpo IgG a condiciones reductoras.

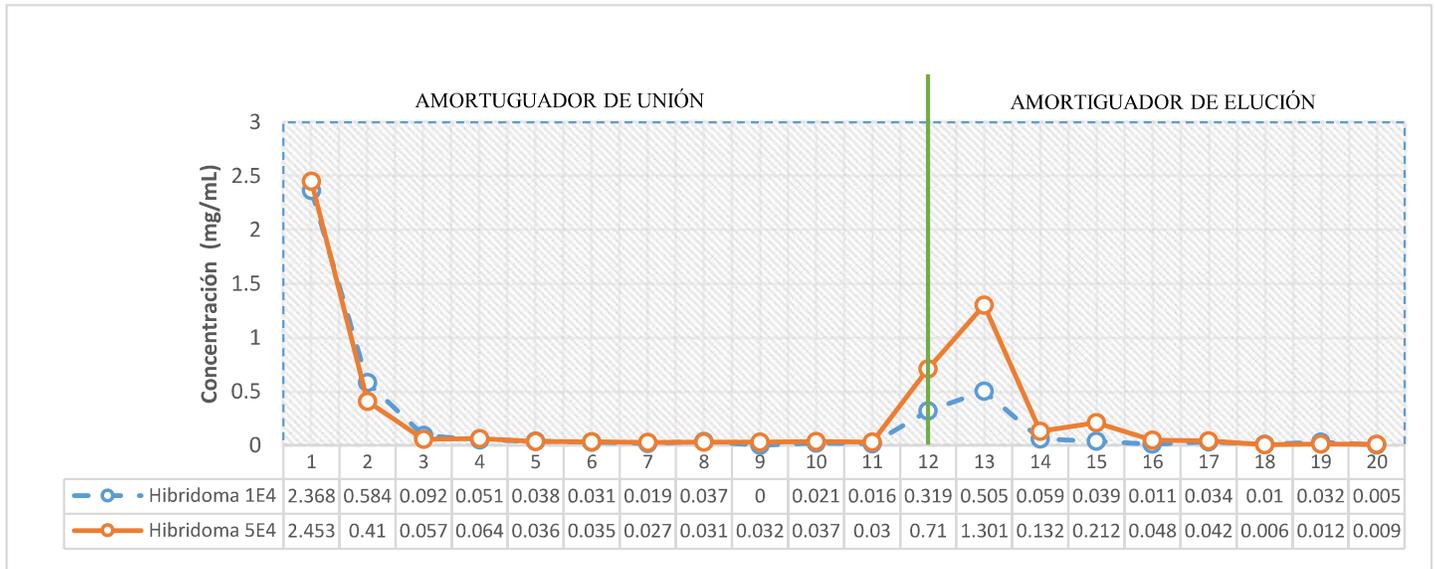


Gráfico 1. Purificación de sobrenadante del hibridoma 1E4 y 5E4 por tiofilización

Una vez comprobada la pureza de los anticuerpos purificados se realiza otro ELISA indirecto para comprobar la efectividad de la purificación, por lo tanto en total se trabajaron con “3 anticuerpos” 1 y 2 serán anticuerpos producidos por el hibridoma 1E4, pero purificado por diferentes procesos 1E4 IgM (cromatografía tiofilica) y 1E4 IgG (cromatografía por afinidad a proteína A), y 3 son anticuerpos 5E4 IgM producidos por las células 5E4 purificados por cromatografía tiofilica, desde este párrafo en adelante se nombraran de esa manera.

Posteriormente se montan tres ELISA indirecto para conocer la especificidad del anticuerpo monoclonal (reacciones cruzadas) con diferentes antígenos de diversos parásitos. Gráfico 2 (AcMo si purificar), Gráfico 3 (AcMo purificados IgM) y Gráfico 3 (AcMo purificados IgM e IgG).

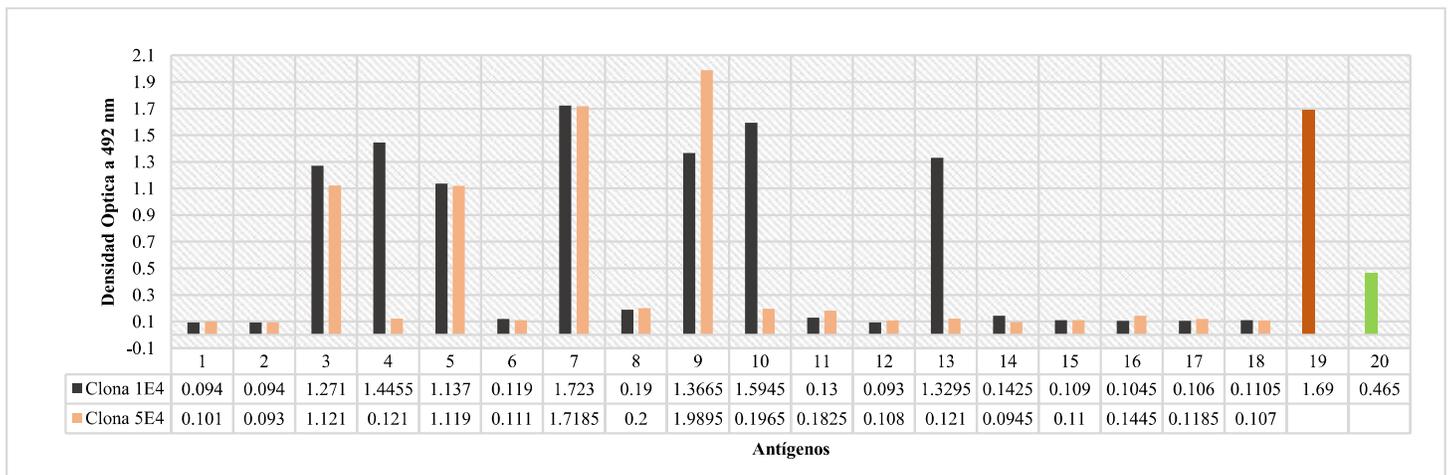
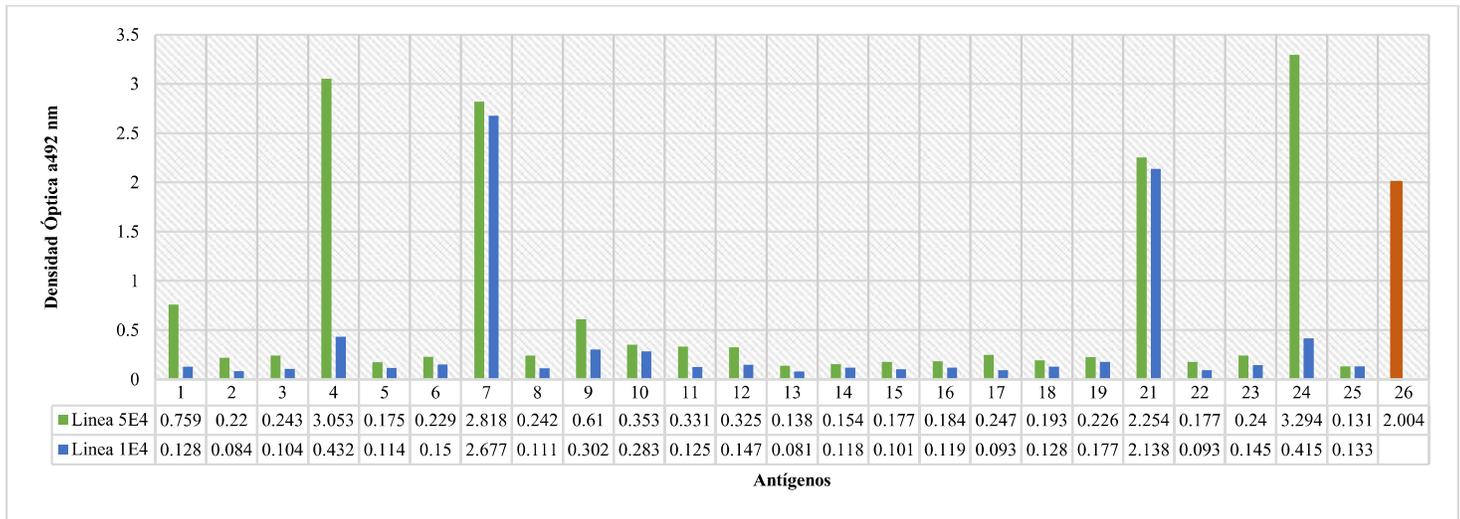


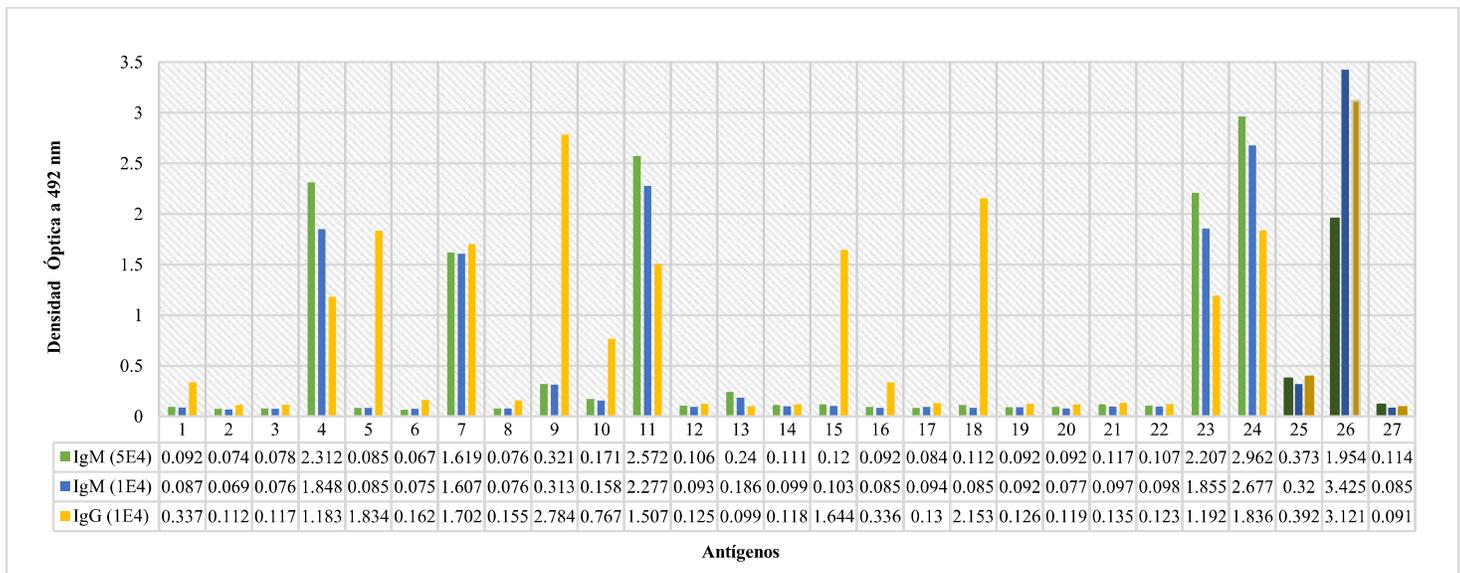
Gráfico 2. Evaluación de reacciones cruzadas evaluadas por ELISA indirecto de sobrenadante  $\alpha$ -*Toxocara canis* (1E4 y 5E4). Antígenos: 1. *Trichinella spiralis* 2015; 2. *Toxocara canis* 2011; 3. *Toxocara canis* (Excreción-Secreción) 2019; 4. *Ascaris lumbricoídes* 2011; 5. *Toxoplasma gondii* (Peritoneo de ratón); 6. *Taenia crassiceps* (Glicoproteínas); 7. *Taenia crassiceps* (Extracto crudo); 8. *Taenia crassiceps* (Fluido vesicular); 9. *Toxocara canis* (Extracto crudo) 10. *Ascaris sp*; 11. *Hymenolepis nana*; 12. *Faciola Hepática*; 13. *Ascaris sp*; 14. *Ascaris suum*; 15. *Giardia* 04/08/2000; 16. *Taenia saginata*; 17. *Giardia*; 18. *Entamoeba histolytica*; 19. Control de conjugados. 20. Control negativo (Ag de leptospira).

En el Grafico 1, se aprecian títulos mayores al del control negativo, cuando el sobrenadante 1E4 se hace reaccionar con Ag *Toxocara canis* (Excreción-Secreción) 2019, *Ascaris lumbricoídes* 2011, *Toxoplasma gondii* (Peritoneo de ratón), *Taenia crassiceps* (Extracto crudo), *Toxocara canis* (Extracto crudo), *Ascaris sp* y *Ascaris sp*; por otro lado, cuando se hace reaccionar el sobrenadante 5E4 se cuantificaron títulos mayores a 1 con *Toxocara canis* (Excreción-Secreción) 2019, *Toxoplasma gondii* (Peritoneo de ratón), *Taenia crassiceps* (Extracto crudo) y *Toxocara canis* (Extracto crudo), para este ensayo se utiliza como AcMo secundario IgG (H+L).



**Gráfica 3.** Evaluación de reacciones cruzadas evaluadas por ELISA indirecto de anticuerpos purificados por en columna HiTrap IgM. Antígenos: **1.** *Trichinella spiralis* 2015; **2.** *Trichinella spiralis* 2018; **3.** *Toxocara canis* 2011; **4.** *Toxocara canis* (Excreción-Secreción) 2019; **5.** *Ascaris lumbricoídes* 2011; **6.** *Toxocara canis* (Excreción-Secreción); **7.** *Toxoplasma gondii* (Peritoneo de ratón); **8.** *Taenia crassiceps* (Glicoprotinas); **9.** *Taenia crassiceps* (Extracto crudo); **10.** *Taenia crassiceps* (Fluido vesicular); **11.** *Ascaris sp*; **12.** *Hymenolepis nana*; **13.** *Faciola Hepática*; **14.** *Ascaris sp*; **15.** *Ascaris suum*; **16.** *Giardia* 04/08/2000; **17.** Taquizoito; **19.** *Giardia*; **20.** *Entamoeba histolytica*; **21.** *Toxoplasma gondii*; **22.** *Trichinella spiralis* (Excreción-Secreción) 23/01/16; **23.** Larvas *Toxocara canis* (adulto); **24.** SN *Toxocara canis*; **25.** Control negativo (Ag de leptospira) ; **26.** Control de conjugados.

Los sobrenadantes de los hibridomas anteriores se purificaron por tiofilización en una columna pre-empaquetada HiTrap IgM Purification HP, se utiliza  $\alpha$ -IgM como AcMo secundario, y se observa tanto una disminución de las reacciones cruzadas y aumento considerable en la especificidad del AcMo por el antígeno específico. Sin embargo, se obtuvieron títulos mayores a 2 cuando los AcMo se hacen reaccionar con antígeno de *toxoplasma gondii*.

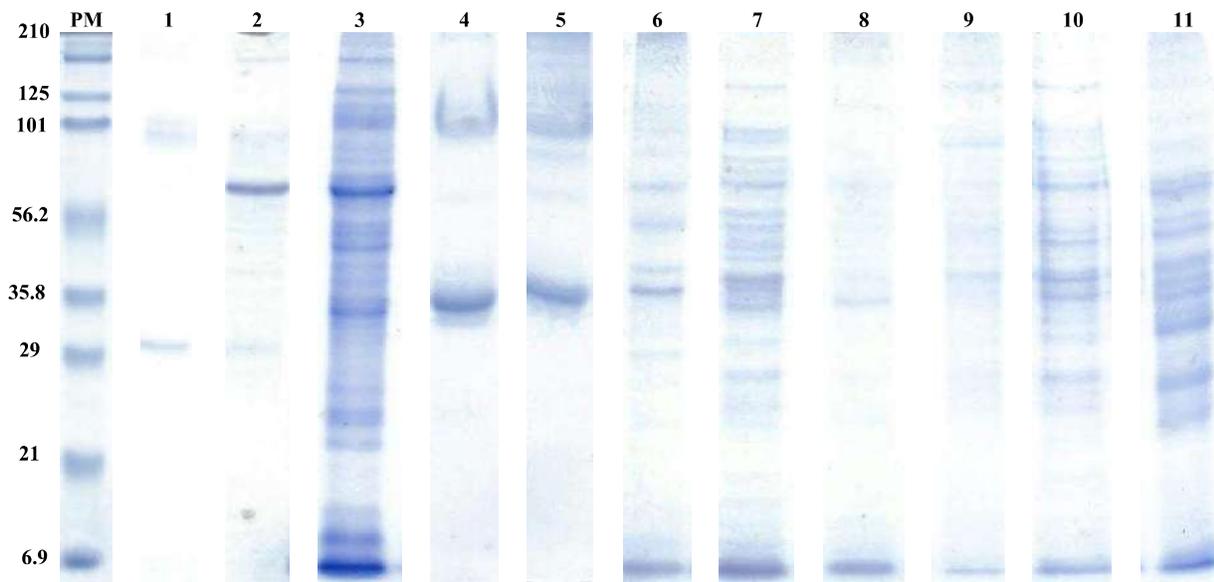


**Gráfica 4.** Comparación de reacciones cruzadas evaluadas por ELISA indirecto de anticuerpos purificados con proteína A vs tiofilización. Antígenos: **1.** *Trichinella spiralis* 2015; **2.** *Trichinella spiralis* 2018; **3.** *Toxocara canis* 2011; **4.** *Toxocara canis* (Excreción-Secreción) 2019; **5.** *Ascaris lumbricoídes* 2011; **6.** *Trichinella spiralis* (Excreción-Secreción) 2019; **7.** *Toxoplasma gondii* (Peritoneo de ratón); **8.** *Taenia crassiceps* (Glicoprotinas); **9.** *Taenia crassiceps* (Extracto crudo); **10.** *Taenia crassiceps* (Fluido vesicular); **11.** *Toxocara canis* (Excreción- Secreción); **12.** *Ascaris sp*; **13.** *Hymenolepis nana*; **14.** *Faciola Hepática*; **15.** *Ascaris sp*; **16.** *Ascaris suum*; **17.** *Giardia* 04/08/2000; **18.** *Taenia saginata*; **19.** *Giardia*; **20.** *Entamoeba histolytica*; **21.** Larvas *Toxocara canis* (adulto) **22.** Larvas *Toxocara canis* (adulto); **23.** *Toxocara canis* (Extracto crudo) filtrado en membrana Amicon; **24.** *Toxocara canis* (Extracto crudo); **25.** Control negativo (Ag de leptospira); **26.** Control de conjugados; **27.** Blanco con PBS.

En 2015 Rodríguez y colaboradores hicieron la detección de reacciones cruzadas por ELISA con el AcMo INP-1E4G4C2 contra antígenos de varios parásitos tales como *Toxocara canis* antígeno somático adulto, *Toxocara cati*, *Ascaris suum*, *Ancylostoma caninum*, *Trichinella spiralis*, *Fasciola hepática*, *Dipilidium caninum*, *Giardia intestinalis*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania spp*, *tricomonas vaginalis* y *Acantamoeba spp*, todas ellas presentaron títulos menores a 0.300, y al contrario, cuando se utilizaron *Toxocara canis* L 2 TES y *Toxocara canis* larvas antígeno somático se obtuvieron títulos de 2.5, todas ellas a una absorbancia a 490 nm.

Sin embargo, de acuerdo con los resultados del Gráfico 3 no hay reactividad cruzada con los AcMo (1E4 y 5E4), pero cuando se utiliza el AcMo purificado con proteína A (1E4 IgG) (Gráfico 4), hay reacción cruzada con el antígeno de *Ascaris lumbricoides*, *Toxoplasma gondii* (Peritoneo de ratón), *Taenia crassiceps* (Extracto crudo), *Taenia crassiceps* (Fluido vesicular), *Ascaris sp*, *Taenia saginata*. Explicación mas adelante.

Posteriormente, de los antígenos que presentaron reacción con los anticuerpos anti-PEST, se sometieron a electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras, los resultados se expresan en el Figura 6 y lo PM en las Tablas 6.1 y 6.2, los cuales se obtuvieron a través del software Gelanalyzer en <http://www.gelanalyzer.com/> (Anexo 2; Tabla 11).



**Figura 6.** Electroforesis SDS-PAGE. **1.** *Toxocara canis* (ES); **2.** *Toxocara canis* (Extracto crudo); **3.** Larvas adultas de *Toxocara canis*; **4.** *Toxocara canis* concentrado con Amicon 2015 utilizado en 2019; **5.** *Toxocara canis* (ES) con inhibidores enzimáticos; **6.** *Ascaris lumbricoides* 2011; **7.** *Ascaris suum*; **8.** Ag *Ascaris sp*; **9.** *Taenia crassiceps* (Extracto crudo); **10.** *Taenia crassiceps* (Fluido vesicular); **11.** *Taenia saginata*.

Los carriles 1,2,4 y 5 que son los Ag de TES presentan bandas ya caracterizadas por diferentes autores, Maizels en 2013 describe por primera vez los componentes moleculares por su peso molecular en el análisis SDS-PAGE, con bandas principales evidentes a 26, 32, 45, 55, 70, 120 y 400 kDa, todas estas proteínas son glicosiladas, antigénicas y se comparten entre diferentes especies de *Toxocara*, al igual que con otros nematodos ascaridos. Aunado a ello, Muñoz y Alba en 2010, informaron de un conjunto de tres bandas de TES que migran muy cercanamente y que son reconocidas por un solo AcMo, por lo que se han considerado variantes del mismo antígeno de 120 kDa y en otros estudios con muestras de TES teñidas con azul de Coomassie se observaron componentes moleculares de ~ 400 y 120 kDa junto con una banda nueva de 180 kDa que mostraron actividad de tipo serina. Esto es en parte consistente con las serinas proteinasas de 120 (doblete) y 32 kDa reportadas previamente en TES L2 (González et al, 2014). Los pesos moleculares que se aproximan a estos resultados se resaltaron con azul en las Tablas 6.1 y 6.2.

Por otro lado, Longuinhos y colaboradores en 2011 consideraron la limitada sensibilidad, especificidad y alta reactividad cruzada presentada por el antígeno crudo *Toxocara*, realizaron la identificación, separación y prueba de los antígenos semipurificados. La electroforesis del antígeno crudo identificó bandas de antígeno con pesos moleculares estimados de 210, 120, 97, 95, 68, 58, 42, 40 y 30 kDa, el corrimiento es similar al presentado en el carril 3, donde se logran observar diferentes bandas a través del corrimiento en la Figura 6 y Tabla 6.1 se muestran 19 bandas con sus respectivos pesos

moleculares. En otro estudio realizado por Sperottoa y colaboradores se estimaron tamaños de bandas teñidas con azul brillante de Coomassie entre 10, 15, 25, 35, 50, 75, 150 y 225 kDa.

En el carril 7 perteneciente a *A. suum*, Arteaga y Jara en 2013 informaron de proteínas de 21.5, 50.6 kDa, las cuales coinciden con otra investigación donde se ha trabajado con extractos de órganos reproductores y cutícula de *A. suum*, y las bandas de 18.5, 25.4 kDa coinciden con los antígenos de excreción-secreción. La banda cuyo peso es de 34.6 kDa ha sido detectada como antígeno de excreción-secreción de larvas de estado tres y también en antígenos somáticos. Los antígenos de peso de 41.9 y 45 kDa están dentro del rango de los antígenos cuticulares de los cuales están comprendidos entre 36 a 47 kDa, también similares a las expresadas con *Ascaris sp.*, en la Tabla 6.2. Sin embargo, los antígenos de peso de 22 y 27 kDa son proteínas que no son específicas de *A. suum*, porque otros autores las han determinado en infecciones producidas por *Anisakis simplex*. Igualmente, las proteínas de 61.1 y 65.0 kDa son responsables de reacción cruzada con *T. canis*; porque se encuentran dentro del rango 55-66 kDa.

**Tabla 6.1.** Pesos moleculares de cada carril.

Bandas	Carril 1		Carril 2		Carril 3		Carril 4		Carril 5		Carril 6	
	RF	PM										
1	0.176	120.504	0.042	185.780	0.053	179.473	0.176	120.504	0.015	202.770	0.006	208.930
2	0.195	113.240	0.182	118.032	0.113	147.571	0.319	75.860	0.057	177.01	0.288	83.753
3	0.59	31.550	0.283	85.114	0.168	123.595	0.522	39.560	0.106	151.008	0.358	66.834
4					0.217	105.440			0.175	120.781	0.443	50.820
5					0.239	98.175			0.23	101.160	0.482	44.771
6					0.271	88.512			0.306	79.070	0.597	30.832
7					0.298	81.096			0.501	42.073		
8					0.36	66.374						
9					0.373	63.680						
10					0.399	58.614						
11					0.435	52.120						
12					0.461	47.863						
13					0.499	42.364						
14					0.518	29.811						
15					0.661	25.061						
16					0.708	21.577						
17					0.761	18.155						
18					0.889	11.995						
19					0.94	10.186						

**Tabla 6. 2..** Pesos moleculares de cada carril.

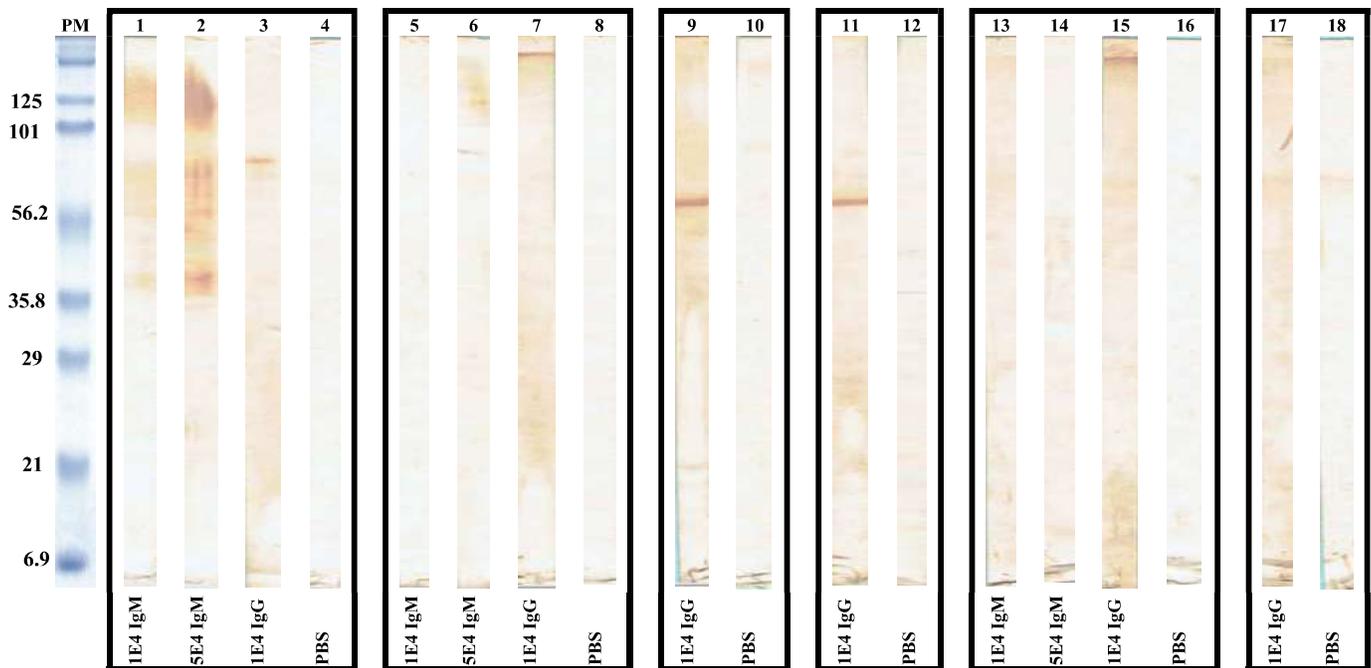
Bandas	Carril 7		Carril 8		Carril 9		Carril 10		Carril 11	
	RF	PM	RF	PM	RF	PM	RF	PM	RF	PM
1	0.099	154.525	0.136	137.088	0.051	180.302	0.104	152.055	0.211	107.647
2	0.178	119.674	0.284	84.920	0.094	158.490	0.184	117.490	0.294	82.224
3	0.196	112.980	0.456	48.641	0.202	110.662	0.236	99.083	0.352	68.234
4	0.232	100.462	0.497	42.560	0.277	86.900	0.287	84.140	0.373	63.680
5	0.252	94.189			0.33	73.114	0.33	73.114	0.429	53.088
6	0.279	86.298			0.362	65.917	0.369	64.565	0.482	44.771
7	0.333	72.444			0.444	50.582	0.389	60.534	0.54	37.068
8	0.353	67.920			0.633	27.479	0.456	48.561	0.644	26.485
9	0.391	60.120					0.488	43.954	0.712	21.281
10	0.413	55.976					0.534	37.844		
11	0.454	48.978					0.562	34.594		
12	0.469	46.666					0.637	27.102		
13	0.501	42.073					0.693	2.650		
14	0.563	34.435								
15	0.628	27.925								
16	0.946	9.977								

Por otra parte, los estudios filogenéticos basados en una variedad de criterios de evaluación comparativos colocan a *T. ovis* en ovejas y *T. saginata* en bovinos cerca de *T. solium* predominantemente en los músculos estriados de los cerdos y tienen a *T. crassiceps* como un pariente más distante. parásito natural de los roedores y es transmitida por los caninos como hospedadores definitivos (Lightowlers, 2010).

Valdez y colaboradores (1994) evaluaron doce fracciones de antígeno diferentes aisladas de los cisticercos de *T. crassiceps* con respecto a su capacidad para inducir resistencia frente a un desafío con 10 cisticercos de *T. crassiceps* en ratones macho BALB / cAnN. Las 12 fracciones de antígeno se clasificaron como protectoras (200, 123, 74, 66, 56, 40-50, 27 y 8-14 kDa), facilitadores (220-205 kDa), o irrelevantes (150-160, 93, 108 kDa), según su efecto sobre la carga parasitaria. De a cerdo a

la Tabla 6.2, tanto el antígeno *T. crassiceps* de extracto crudo como del fluido vesicular, se pueden observar corrimientos de bandas con pesos moleculares que se aproximan 74, 66,50 y 27 kDa.

Según la literatura, los antígenos TES contienen epítomos antigénicos de reacción cruzada con otros helmintos, por lo tanto, puede haber inespecificidad, ya que por el momento sólo se ha evaluado con el método de ELISA indirecto, y lo que se sugiere es la confirmación con Western Blot. A continuación, en la Figura 7 se muestra un WB con todos aquellos Ag que presentaron reacción con los anticuerpos anti-PEST, en algunas de las tiras se puede ver la marca donde se presenta la interacción Ag- AcMo, y en la Tabla 7 se muestran el peso molecular del péptido antigénico con el que el AcMo anti-PEST reacciona, éstos obtenidos a través del software Gelanalyzer en <http://www.gelanalyzer.com/> (Anexo 2; Tabla 12)



**Figura 7.** Western blot . 1 al 4 *Toxocara canis* (ES); 5 al 8 *Ascaris lumbricoides*; 9 al 10 *Taenia crassiceps* (Extracto crudo); 11 al 12 *Taenia crassiceps* (Fluido vesicular); 13 al 16 *Ascaris sp.*; 17 al 18 *Taenia saginata*.

*Ascaris lumbricoides* es un nematodo intestinal común en los humanos especialmente en los menores de edad, y la reactividad con este helminto pudo deberse a los alérgenos de poliproteína de nematodos (NPA), los cuales son encontrados en numerosos nematodos como componente principal del líquido pseudocoelómico; se sintetizan como polipéptidos grandes que posteriormente se cortan proteolíticamente en unidades de polipéptidos de 15 kDa y es abundante en productos somáticos y excretores/ secretores de los parásitos, el alérgeno del líquido corporal *Ascaris*-1 (ABA-1) fue la primera proteína *Ascaris* bien caracterizada; y el TBA-1 pertenece a *Toxocara canis*; cuya secuencia de aminoácidos N-terminal revela un alto grado de similitud al ABA-1, por lo tanto, comparten epítomos comunes. ABA - 1 es un componente de extracto corporal tanto como un ES. Sin embargo, a diferencia de otros NPA, se ha informado que TBA - 1 sólo existe en el extracto del cuerpo de *T. canis*, pero no en el ES (Yahiro et al, 1998).

O bien, en el 2003, descubrieron que dos anticuerpos monoclonales reconocen antígenos con fosforilcolina (PC), y se observaron similitudes cercanas entre los ascaridos (*T. canis*, *A. simplex* y *A. lumbricoides*), lo que sugiere que la fosforilcolina está unida a estructuras idénticas o muy similares en muchos nematodos de diferentes especies (Perteguer et al. 2003). La expresión de PC puede variar con respecto a la etapa del ciclo de vida o la variante de un organismo, sobre productos secretados de nematodos filariales adultos, parece desempeñar un papel en la promoción de su longevidad al modular las respuestas de linfocitos en el hospedador, podría ser la misma molécula en la superficie de la larva infecciosa que actúa como un objetivo para la inmunidad dependiente de anticuerpos (Harnett & Harnett, 1999).

**Tabla 7.** Pesos moleculares detectados de la reactividad cruzada con otros antígenos Figura 7.

Antígeno	Anticuerpo		1		2		3		4	
			RF	PM	RF	PM	RF	PM	RF	PM
<i>Toxocara canis</i> (ES)	1	<b>1E4 IgM</b>	0.074	167.486	0.244	96.650	0.438	76.573	0.316	51.609
	2	<b>5E4 IgM</b>	0.089	159.551	0.223	103.442	0.299	80.901	0.429	53.134
	3	<b>1E4 IgG</b>	0.206	109.288						
<i>Ascaris lumbricoides</i>	7	<b>1E4 IgG</b>	0.022	198.153						
<i>Taenia crassiceps</i> (Extracto crudo)	9	<b>1E4 IgG</b>	0.307	78.835	0.829	14.574				
<i>Taenia crassiceps</i> (Fluido vesicular)	11	<b>1E4 IgG</b>	0.304	79.603						
<i>Ascaris sp</i>	15	<b>1E4 IgG</b>	0.009	206.661						

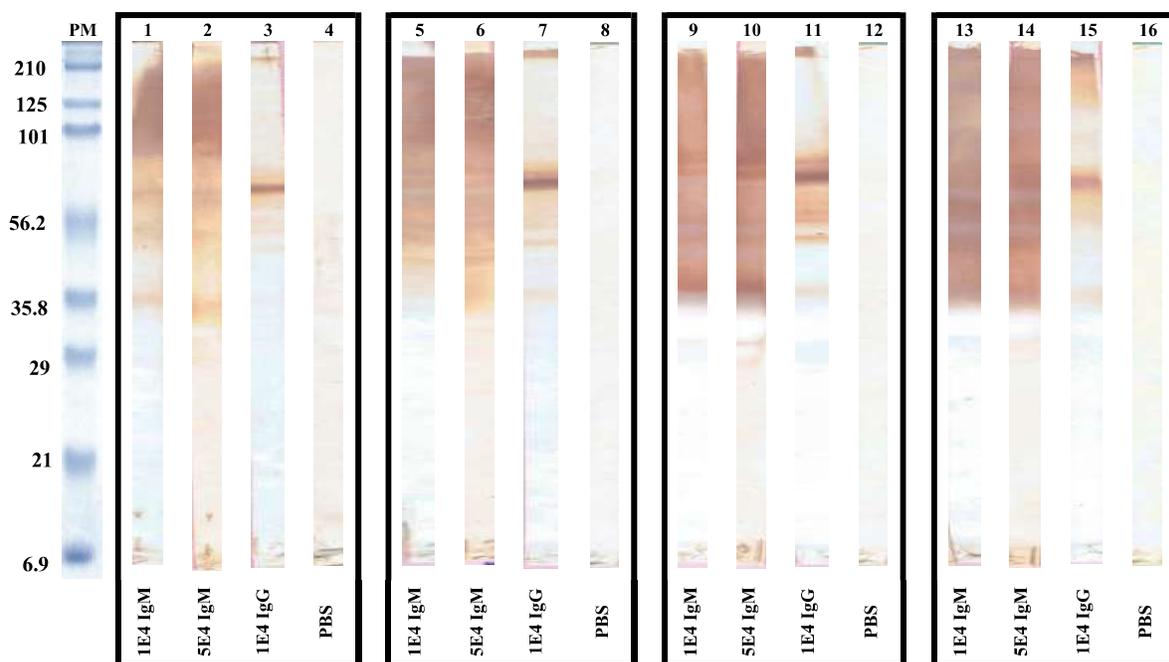
Bowman y colaboradores en 1987, obtuvieron dos anticuerpos monoclonales IgM, donde se probó su fluorescencia contra las superficies de larvas en estadio infeccioso de *T. cati*, *Baylisascaris procyonis*, *T. leonina*, *Ascaris suum*, *Porrocaecum sp.* y *Dirofilaria immitis*. Uno de estos dos anticuerpos se une a la superficie de *T. canis* y *T. cati* mientras que el otro se une solo a la superficie de *T. canis*; ninguno de los dos reaccionó con las otras larvas de ascaridoide o las larvas de *D. immitis*. Se usaron técnicas de inmunoelectrotransferencia enzimática para demostrar que el anticuerpo de reacción cruzada reconoció antígenos con pesos moleculares de aproximadamente 200 kDa, (Bowman et al, 1987), este mismo resultado se observó cuando se utilizaron antígenos de *Ascaris sp* y *Ascaris lumbricoides* en el ensayo de inmunoelectrotransferencia enzimática donde el anticuerpo IgG 1E4 reaccionó con antígenos de aproximadamente a 206.6 y 198.1 kDa respectivamente.

Existen relaciones entre antígenos expuestos en la superficie, secretados y somáticos de nematodos como *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum* y *Toxocara canis*. Estos parásitos tienen una significativa similaridad antigénica, detectada por WB (De Noya et al, 2001).

Por otro lado, Ishida y colaboradores utilizaron suero de conejo anti-*Taenia solium* y suero de conejo anti-*Taenia crassiceps* (fluido vesicular) en ELISA, donde se realizó tapiz con Ag de *Toxocara*, dicho ensayo no dio resultados positivos. Y, por otro lado, en el mismo estudio se realizó lo contrario, el suero de conejo anti-*TES* también mostró resultados negativos mediante ELISA usando antígenos de *Taenia*. Además, los perfiles WB de reactividad cruzada entre estas helmintiasis diferían considerablemente. Estos hallazgos apoyan la interpretación de que no ocurre la reactividad cruzada entre la cisticercosis y la toxocariasis. Por tanto, podemos deducir que la reactividad de los sueros de pacientes con cisticercosis, con TES, probablemente se deba a los anticuerpos anti-*TES* de la infección por *Toxocara* presente o pasada (Ishida et al, 2003). Por consiguiente, cuando el anticuerpo se hizo reaccionar con *Taenia saginata*, *Taenia crassiceps* (Fluido vesicular), *Taenia crassiceps* (Extracto crudo) y *Toxoplasma gondii* (Peritoneo de ratón), se cree que hubo reacción, porque había sustancias no pertenecientes a los Ag de los helmintos, como el medio que los contenían, ya que en la evaluación de las reacciones cruzadas con los AcMo en el sobrenadante de cultivo celular dieron lugar a reacciones inespecíficas, debido a que el medio DMEN se suplementa con el 10% de suero fetal bovino y se encuentran proteínas de alto peso molecular como la albumina (Gráfico 2 y Figura 5 ).

Una vez confirmadas la reactividad cruzada de los AcMo en cuestión, se procedió a probar a cada uno de los AcMo uno con el antígeno diana, pero con diferentes tratamientos (purificado de excreción- secreción, sobrenadante de cultivo de *T. canis* L<sub>2</sub>, sobrenadante de cultivo de *T. canis* L<sub>2</sub> concentrado en tubos Amicon y *Toxocara canis* ES con inhibidores enzimáticos. A continuación, en la Figura 8 se muestra un WB con los Ag antes mencionados, en la Tabla 8 se muestran el PM de los péptido antigénico, obtenidos con ayuda del software Gelanalyzer (Anexo 2; Tabla 13).

No todas las especies de hospederos reconocen los mismos antígenos excreción secreción de *T. canis*. Los conejos reconocen hasta nueve antígenos; cerdos, dos; humanos, siete; ratones, cuatro; y gerbos, ocho. Estos trabajos sugieren que la inmunodominancia de los Ag-PEST es particular para cada especie de huésped (Muñoz & Alba, 2010); y como puede observarse en las Tabla



**Figura 8.** Western blot. Del numeral 1 al 4 *Toxocara canis* (ES); 5 al 8 *Toxocara canis* (sobrenadante de cultivo de L<sub>2</sub>); 9 al 12 *Toxocara canis* (concentrado por tubos Amicon); 13 al 16 *Toxocara canis* (ES con inhibidores enzimáticos).

**Tabla 8.** Pesos moleculares de la Figura 8.

Antígeno	Anticuerpo		Bandas									
			1		2		3		4		5	
			RF	PM	RF	PM	RF	PM	RF	PM	RF	PM
<i>Toxocara canis</i> (ES)	1	1E4 IgM	0.083	162.677	0.275	87.430	0.355	67.500	0.497	42.645		
	2	5E4 IgM	0.094	156.992	0.278	86.586	0.357	67.065	0.506	41.421		
	3	1E4 IgG	0.267	89.722	0.333	72.477	0.390	60.276				
	4	PBS										
<i>Toxocara canis</i> (sobrenadante de cultivo de L <sub>2</sub> )	5	1E4 IgM	0.127	141.100	0.233	100.150	0.255	93.272	0.294	82.219		
	6	5E4 IgM	0.049	181.585	0.141	134.855	0.297	81.426	0.418	55.058		
	7	1E4 IgG	0.265	90.304	0.344	69.944	0.386	61.061	1.637	43.340		
	8	PBS										
<i>Toxocara canis</i> (concentrado por tubos Amicon)	9	1E4 IgM	0.211	107.535	0.235	99.504	0.335	72.009	0.373	63.683	0.470	46.536
	10	5E4 IgM	0.212	107.188	0.239	98.226	0.339	71.084	0.376	63.068	0.479	45.201
	11	1E4 IgG	164.52	77.886	70.03	62.75	58.99	54.70	51.96	45.92	31.82	21.23
	12	PBS										
<i>Toxocara canis</i> (ES con inhibidores enzimáticos)	13	1E4 IgM	0.265	90.304	0.313	77.320	0.39	60.276	0.470	46.536		
	14	5E4 IgM	0.269	89.143	0.317	76.326	0.389	60.471	0.477	45.494		
	15	1E4 IgG	0.059	175.806	0.257	92.671	0.494	43.060				
	16	PBS										

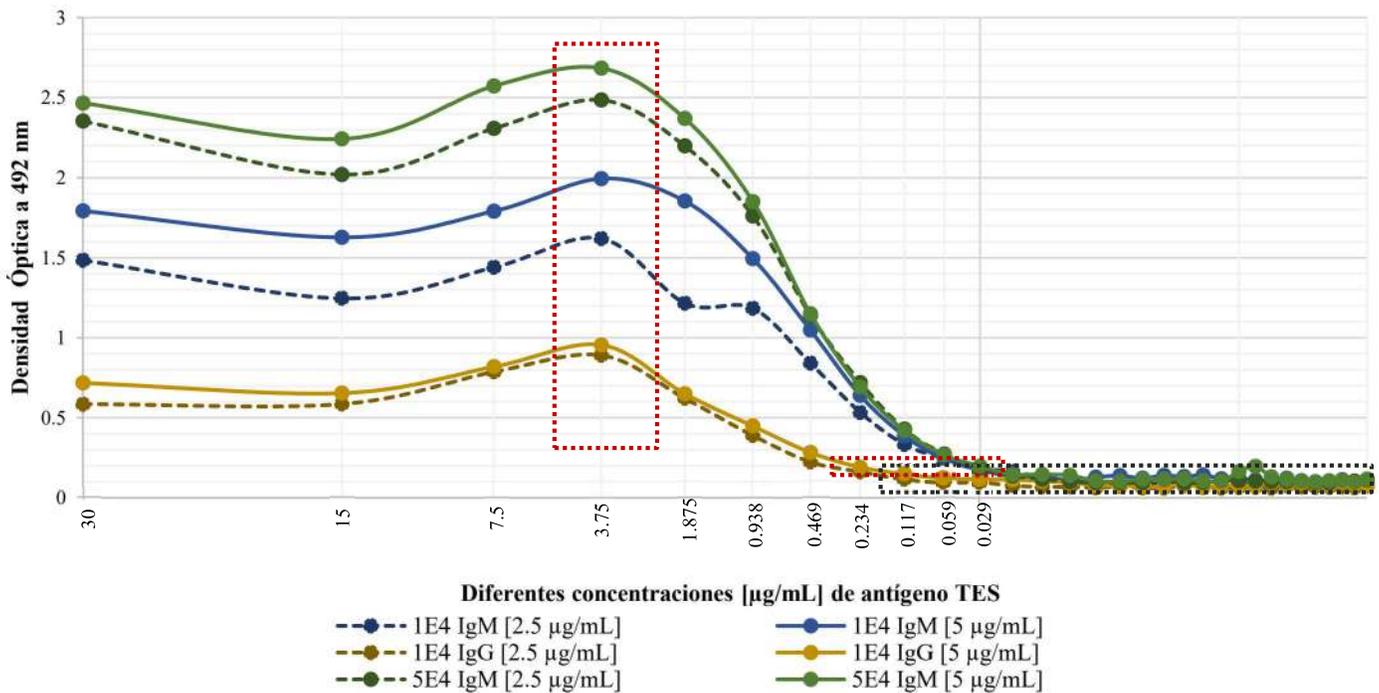
Ponce y colaboradores (2014) obtuvieron PM en un Western Blot que van desde 23.4kDa, 26.6 kDa, 32.4 kDa, 43.9 kDa a 55.6 kDa, similares a los encontrados en SDS-PAGE.

De acuerdo a los pesos moleculares calculados en el presente trabajo, éstos se aproximan a los de mucinas y lectinas tipo C, las primeras son componentes abundantes de la familia de las glucoproteínas TES-120 secretadas por este parásito, todas ellas difieren en estructura y las proporciones relativas de residuos de serina o treonina y un número variable de dominios de 36 aminoácidos y seis cisteínas, dominios SXC se encuentran en muchas proteínas de nematodos ascaridos, además como ya se mencionó con anterioridad también se han observado componentes de ~ 400 y 120 kDa junto con una banda nueva de 180 kDa mostraron actividad de tipo serina. Por consiguiente, muchas de éstas glucoproteínas probablemente están fuertemente atacadas por los anticuerpos IgM,, por lo tanto, puede que tanto AcMo 5E4 IgM y 1E4 IgM, reconozca este tipo de antígeno; en cuanto a las segundas son particularmente abundantes en las secreciones de *T. canis* y parecen estar bien conservado dentro del género *Toxocara*; el AcMo anti-Tc-CTL-1 reacciona con proteínas tanto en *Toxocara*

*cati* (como en *Toxocara vitulorum*; aunque con diferentes pesos moleculares, lo que indica que la secreción de lectinas de tipo C podría ser un sello distintivo compartido de este género, y bajo esta premisa 1E4 IgG reconoce mucinas, ya que anteriormente este AcMo se ha probado con *T. cati* y no hubo reacción cruzada.

En los espectros de la tabla se puede observar que tanto los espectros con sobrenadante como el concentrado en tubos Amicon, se ven parecidos pero los picos son más prominentes en este último, lo cual podría deberse a que el medio que contenía el antígeno impide que el anticuerpo pueda reaccionar con el epítipo, sin embargo, la concentración del antígeno no es un proceso en cual se elimine en su totalidad el medio de cultivo y por lo tanto la robustez de los picos si es considerable menor. Con el antígeno purificado la intensidad de los picos se ve disminuida, pero se ve con claridad donde se encuentra la interacción Ag – AcMo y cuando al antígeno purificado se le adicionan los inhibidores enzimáticos el reconocimiento a través de los espectros se ve muy similar al del extracto crudo y al concentrado del extracto crudo, con excepción de que también se pueden ver lo picos con más claridad.

Ahora, se analiza el límite de cuantificación de los anticuerpos con respecto al antígeno *Toxocara canis* (ES) purificado, para ello se realiza con ELISA indirecto donde la concentración del antígeno inicial es de 30 µg/mL, la cual va disminuyendo por diluciones doble seriadas, donde se utilizaron tres variables (AcMo: 1E4 IgM, 1E4 IgG y 5E4 IgM) y dos concentraciones por anticuerpo (2.5 y 5 µg/mL).



**Gráfica 5.** Límite de detección del antígeno *T. canis*. Las placas se tapizaron con antígeno *Toxocara canis* (Excreción-Secreción) 2019 de la siguiente manera; de una concentración inicial de 30 µg/mL, se hicieron diluciones dobles seriadas hasta el pozo 31, este proceso se realizó por sextuplicado para cada anticuerpo con diferente concentración.

Tabla 9. Títulos de los límites de detección.

	1E4 IgM		1E4 IgG		5E4 IgM	
	[2.5 µg/mL]	[5 µg/mL]	[2.5 µg/mL]	[5 µg/mL]	[2.5 µg/mL]	[5 µg/mL]
1	1.484	1.792	0.585	0.718	2.353	2.466
2	1.246	1.627	0.586	0.654	2.02	2.242
3	1.44	1.791	0.787	0.819	2.308	2.573
4	1.62	1.994	0.89	0.955	2.485	2.684
5	1.216	1.854	0.621	0.65	2.198	2.37
6	1.184	1.494	0.389	0.448	1.761	1.851
7	0.841	1.047	0.224	0.283	1.139	1.149
8	0.533	0.639	0.162	0.191	0.72	0.691
9	0.334	0.388	0.114	0.148	0.428	0.419
10	0.246	0.243	0.094	0.121	0.273	0.268
11	0.184	0.173	0.096	0.116	0.187	0.198
12	0.166	0.136	0.076	0.113	0.137	0.147
13	0.124	0.133	0.069	0.104	0.117	0.147
14	0.105	0.108	0.068	0.094	0.101	0.14
15	0.101	0.128	0.063	0.079	0.094	0.106
16	0.091	0.139	0.071	0.075	0.095	0.103
17	0.089	0.122	0.062	0.072	0.095	0.115
18	0.09	0.14	0.06	0.07	0.114	0.117
19	0.093	0.132	0.074	0.083	0.092	0.118
20	0.096	0.143	0.064	0.068	0.096	0.106

Se observa que los tres anticuerpos tienen un comportamiento similar del como reconocen al antígeno, ya que, a mayores cantidades de antígeno hay impedimento estérico en los sitios reactivos (epítipo), por tanto, el anticuerpo no puede interactuar con el epítipo y a medida que disminuye la concentración de Ag se puede observar que en los tres anticuerpos hay mayor número de interacciones cuando manejamos el antígeno a concentraciones 3.75 µg, es cuando alcanzamos la saturación de los anticuerpos (morado), y si hay disminución de la cantidad de antígeno también disminuyen las interacciones Ag - AcMo, en esta etapa se detectaron títulos con un promedio de 0.248 para cuando se utilizan concentraciones de anticuerpo del 2.5µg/mL; y valores de 0.265 en concentraciones de anticuerpo 5µg/mL. Si se desea trabajar con estas cantidades de AcMo, se recomienda que tanto para 5E4 IgM e 1E4 IgG, se recomienda utilizar concentraciones de 2.5 µg/mL.

De acuerdo al análisis de varianza (Anexo 3) la F es mayor que el valor de P, y por lo tanto se puede decir que la varianza arrojada por los datos demuestra que cada AcMo es diferente entre cada uno, a pesar de que el reconocimiento sea similar entre ellos. Por ejemplo, como se observa en el gráfico 5, el 5E4 IgM obtuvo los títulos más altos (medición de la reacción Ag-AcMo) cuando se utilizaron tanto las concentraciones de 2.5 µg y 5 µg, es decir el AcMo tiene más afinidad por el antígeno que los AcMo 1E4 IgM y el 1E4 IgG. Sin embargo, en este trabajo no se mide la fuerza con la que se une el anticuerpo al antígeno y como se observa en el gráfico 5 al utilizar 3.75 µL de antígeno para reaccionar con los diferentes anticuerpos a diferentes concentraciones cada uno, es evidente que contamos con AcMos diferentes ya que tampoco se analizaron los determinantes antigénicos a los que se une cada anticuerpo, entonces las uniones detectadas a través del equipo UV-Visible, son específicos de cada especie.

## Conclusión

Con base en los resultados obtenidos, es posible que el AcMo 1E4 IgM sea una buena opción para poder desarrollar pruebas rápidas que permitan detectar específicamente al TES, para ello también se considera que se realicen pruebas de reactividad cruzada con diferentes nematodos ascaridos. Sin embargo, un inconveniente serio que con este tipo de pruebas que detectan IgM, donde anticuerpos IgM específicos de antígeno TES constituyen un marcador clásico para identificar la *etapa aguda*, no obstante, los anticuerpos IgM se pueden encontrar a lo largo de la carrera de infección, lo que ocasiona inconvenientes para diferenciar entre infecciones *agudas* y *crónicas*. Por otra parte, a pesar de que en este trabajo no se abordan detalladamente los antígenos se podían aprovechar la inmunidad cruzada entre los parásitos ascaridos como *áscaris lumbricoides* en este trabajo, como un modelo conveniente para probar antígenos prometedores destinados al desarrollo de una vacuna contra la helmitiasis.

## Referencias

1. Abbas, A. K., Lichtman, A. H & Pillai, S. (2015). *Inmunología celular y molecular*. Elsevier España. Octava edición, Capítulo 5, pp 102-106.
2. Abou-El-Naga, IF. (2018). *Developmental stages and viability of Toxocara canis eggs outside the host*. Biomédica. Vol. 38: pp 189-97.
3. Amersham Pharmacia Biotech. (S.F). *Antibody structure, classification, and production*. En Capítulo 1 de *Antibody Purification Handbook*. GE Healthcare. p 10.

4. Archelli, S & Kozubsky, L. (2008). *Toxocara y Toxocariosis*. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. Buenos Aires, Argentina. Vol 42(3): pp 379-384.
5. Arpa, L. (2008). *Mecanismos moleculares que regulan la activación clásica y alternativa en los macrófagos*. Tesis doctoral. Institut de Recerca Biomèdica del Parc Científic de Barcelona, pp 24.
6. Arteaga, M. D & Jara, C, A. (2013). *Antígenos del líquido pseudocelómico de Ascaris suum detectados por Western Blot utilizando IgY producidos en Gallus gallus var. Hisex Brown*. Revista Científica de Estudiantes Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú, Vol 1(2): pp 61.
7. Becerril, M. F. (2011). *Parasitología Médica*. Madrid, España: McGraw - Hill Interamericana.
8. Bowman, D. D., Mika-Grieve, M & Grieve, R. B. (1987). *Toxocara canis: monoclonal antibodies to larval excretory-secretory antigens that bind with genus and species specificity to the cuticular surface of infective larvae*. Exp Parasitol. Vol 64(3): pp 458-65.
9. Breña, J. P., Hernández, R., Hernández, A., Castañeda, R., Espinoza, Y., Roldán, W., Ramirez, C & Maguiña, C. (2011). *Toxocariosis humana en el Perú: aspectos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio*. Acta Med Per. Vol 28(4): pp 228-236.
10. Caraballo, L. (2016). *Los diversos efectos de las helmintiasis sobre la inflamación alérgica*. Revista Académica Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales Rev. Vol 40(155): pp 200-208.
11. Chen, J., Liu, Q., Liu, G-H., Zheng, W-B., Hong, S-J., Sugiyama, H., Zhu, X-Q & Elsheikha, H. M. (2018). *Toxocariosis: a silent threat with a progressive public health impact*. Infectious Diseases of Poverty. Vol 7(59): pp 1-13.
12. Ching, W., Wong, V., Muller, B., Rawlin, G & Brown, L. (2010). *Prevention and Treatment of Influenza with Hyperimmune Bovine Colostrum Antibody*. PLoS ONE <https://journals.plos.org/plosone/>. Vol 5(10): pp 3-4.
13. Cortés, N., Núñez, C., Bautista, L. G., Hernández, P. A & Heredia R. (2015). *Presence of anti-Toxocara canis antibodies and risk factors in children from the Amecameca and Chalco regions of México*. BMC Pediatrics. Vol 15 (65).
14. De la Fé, P., Dumenigo, B., Brito, A. E & Aguiar, J. (2006). *Toxocara canis y síndrome Larva migrans visceralis*. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET. Vol 7(4): pp 1-42. Recuperado en 07 de agosto del 2019, de <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040406.html>.
15. De Noya, B., Colmenares, C & Noya, O. (2001). *Comunidad Antigénica y Reactividad Cruzada: Su repercusión en el Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Parasitarias. Especial referencia a Esquistosomiasis*. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica. Vol 20(2): pp 163-171.
16. Del Río, V. H., Nava, K. E., Alba, F., Quintanar, A., Muñoz, M. A., Cuenca, O & Morales, J. (2018). *Endocrine immune interactions during chronic Toxocariosis caused by Toxocara canis in a murine model: New insights into the pathophysiology of an old infection*. Elsevier. Veterinary Parasitology. Vol 252: pp 173-179.
17. Delgado, O & Rodríguez, A. J. (2009). *Aspectos clínico-epidemiológicos de la toxocariosis: una enfermedad desatendida en Venezuela y América Latina*. Boletín de Malaria y Salud Ambiental. Vol 49(1): pp 1-33.
18. Długosz, E., Basałaj., K & Zawistowska, A. (2019). *Cytokine production and signalling in human THP-1 macrophages is dependent on Toxocara canis glycans*. Parasitol Res. Vol 118(10): pp 2925–2933.
19. Fachado, A., Fernández, N., Hernández, E, & Fonseca, L. (1996). *Toxoplasma gondii: caracterización de un anticuerpo monoclonal anti-P30*. Revista Cubana de Medicina Tropical. Vol 48(3): pp 178-183.
20. Fan, C. K & Su, K. E. (2004). *Cross-reactions with Ascaris suum antigens of sera from mice infected with A. suum, Toxocara canis, and Angiostrongylus cantonensis*. Elsevier. Parasitology International. Vol 53(3): pp 263-271.
21. García, A. L. (2018). *“Obtención y evaluación de los productos de excreción-secreción de larvas L2 de Toxocara canis”*. México, CDMX. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
22. Gems, D., Ferguson, C. J., Robertson, B. D., Nieves, R., Page, A.P; Blaxter, M. L & Maizels, R. M. (1995). *An Abundant, trans-spliced mRNA from Toxocara canis Infective Larvae Encodes a 26-kDa Protein with Homology to Phosphatidylethanolamine-binding Proteins*. Journal of Biological Chemistry. Vol 270: pp 18517-18522. Recuperado en 06 de ebrero de 2020, de <https://www.jbc.org/content/270/31/18517.long>
23. Global Health, Division of Parasitic Diseases. (2019). *Parasites-Toxocariosis (also known as roundworm infection)*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Recuperado en 19 de octubre de 2019, de <https://www.cdc.gov/parasites/toxocariosis/index.html>

24. González, G. E., Alba, F., García, C. G., Argüello, R. (2014). *Proteinases in excretory-secretory products of Toxocara canis second-stage larvae: Zymography and modeling insights*. Biomed Res Int. 2014:418708–418709.
25. Harnetta, W & Harnettb, H. M. (1999). *Phosphorylcholine: friend or foe of the immune system?* Elsevier. Immunology Today. Vol 20(3): pp 125-129.
26. Hewitson, J. P., Grainger, J. R & Maizels, R. M. (2009). *Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity*. Elsevier. Molecular and Biochemical Parasitology. Vol 167(1): pp 1-11.
27. Huapaya, P. H., Espinoza, Y., Roldán, W & Jiménez, S. (2009). *Toxocariosis humana: ¿problema de salud pública?* Anales de la Facultad de Medicina. Vol. 70(4): pp 283-290.
28. Ishidaa, M.M.I., Rubinsky-Elefantb, G., Ferreirabc, A.W., Hoshino-Shimizud. S., Vazd, A.J. (2003). *Helminth antigens (Taenia solium, Taenia crassiceps, Toxocara canis, Schistosoma mansoni and Echinococcus granulosus) and cross-reactivities in human infections and immunized animals*. Acta Tropica. Vol 89 (1): pp 73-84.
29. Kaminsky, R., Groothousen, C. M., Zúniga, A. M., Contreras, M., Ferrera, A. M & Henríquez, K. C. (2014). *Infección por Toxocara canis en perros y riesgo de Toxocariosis humana, honduras*. Rev Med Hondur, Vol 82(2): pp 50-55.
30. Kennedy, M. W., Maizels, R. M., Meghji, M., Young, L., Qureshi, F., & Smith, H. V. (1987). *Species-specific and common epitopes on the secreted and surface antigens of Toxocara cati and Toxocara canis infective larvae*. Parasite Immunology, Vol 9(4): pp 407–420.
31. Kinčeková, J., Bánovčín. P., Fedor, M., Dubinský, P., Poláček, H., Pavlinová, H & Šimeková, K. (2008). *A case of complicated cerebral toxocariosis in a 4-year-old child*. Parasitological Institute of SAS, Košice. Helminthologia. Vol 45(4): pp 169 – 172.
32. Lightowlers M, W. (2010). *Fact or hypothesis: Taenia crassiceps as a model for Taenia solium, and the S3Pvac vaccine* Parasite immunology. Vol 32 (11-12): pp 701–709.
33. Longuinhos, P., Nascimento, E., Cançado, Lopes, G. G., Rodrigues, R., Rocha, Lunardi, R, Nascimento, R & Toshio, R. (2011). *Identification of candidate antigens from adult stages of Toxocara canis for the serodiagnosis of human toxocariosis*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Vol 106(2)., pp 200-206.
34. Loukas, A., Hintz, M., Linder, D., Mullin, N. P., Parkinson, J., Tetteh, K. K & Maizels, R. M. (2000). *A family of secreted mucins from the parasitic nematode Toxocara canis bears diverse mucin domains but shares similar flanking six-cysteine repeat motifs*. The journal of biological chemistry. Vol 275(50): pp 39600–39607.
35. Maizels, R. M. (2013). *Toxocara canis: Molecular basis of immune recognition and evasion*. Elsevier. Veterinary Parasitol; Vol 193(4): 365–374.
36. Maizels, R. M., & Page, A. P. (1990). *Surface associated glycoproteins from Toxocara canis larval parasites*. Acta tropica. Vol 47 (5-6): pp 355–364.
37. Maizels, R. M., Tetteh, K. K & Loukas, A. (2000). *Toxocara canis: genes expressed by the arrested infective larval stage of a parasitic nematode*. International Journal for Parasitology. Vol 30(4): pp 495-508.
38. Marín, F. I & Castaño, J. C. (2011). *Establecimiento de una línea celular primaria a partir de huevos con embrión de Toxocara canis*. Infectio. Vol 15(3): pp 184-190.
39. Martínez, A. N. (2014). *“Seroprevalencia de Toxocara spp en niños de Chalco estado de México”*. Universidad Autónoma del Estado de México. Recuperado en 29 de julio de 2019, de
40. Medina, Y., Carpio, J. C., Mata, O., Medina, E., y Escobar, A. (2019). *Manual del XX taller internacional de producción de anticuerpos monoclonales contra agentes infecciosos y otras moléculas*. México-Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE).
41. Montoya, F. J., Almansa, J. E., Parada, S., Eslava, R. P., Arias, A., Toro, R. D & Rojas, J. A. (2007). *Purificación rápida de inmunoglobulina M a partir de suero de cachama blanca (Piaractus brachyomus) y preparación de antisuero policlonal en conejo*. NOVA - Publicación Científica En Ciencias Biomédicas. Vol 5(8): pp 101-212.
42. Morales, F. J., Sariego, I., Vincke, C., Hassanzadeh-Ghassabehd, G., Muyldermansa, S. (2019). *An innovative approach in the detection of Toxocara canis excretory/secretory antigens using specific nanobodies*. International Journal for Parasitology. Vol 49(8): pp 635-645.
43. Mosquera, S., Medina, O., Lares, M., Delgado, O., Martínez, M & Ferrer, E. (2014). *Identificación de Antígenos Inmunodominantes Específicos en Productos de Excreción/Secreción de Larvas De Toxocara Canis*. SABER. Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente. Vol 26(3): pp 273-280.

44. Muñoz, M. A., & Alba, F. (2010). *Antígenos de secreción-excreción de Toxocara canis reconocidos por cachorros del área metropolitana de la Ciudad de México*. Veterinaria México. Vol 41(1): pp 59-64. Recuperado en 09 de julio de 2019, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-50922010000100005&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-50922010000100005&lng=es&tlng=es).
45. Murcia, H. W. (2009). *Importancia de las inmunoglobulinas aviares y sus aplicaciones en inmunoensayos*. Centro de Investigación y Desarrollo. Revista teoría y praxis investigativa. Vol 4(2): p 20.
46. Overgaauw, P. A. M. (1997). *Aspects of Toxocara epidemiology in the Netherlands Epidemiologische aspecten van Toxocara in Nederland*. Critical Reviews in Microbiology. Vol 23: 233-51.
47. Pearson, R. D. (2019). *Toxocariasis (Larva migratoria visceral u ocular)*. Merck Sharp & Dohme Corp. University of Virginia School of Medicine. Recuperado en 06 de octubre del 2019 de <https://www.msdmanuals.com/es-mx/professional/enfermedades-infecciosas/nematodos-gusanos-redondos/toxocariasis>
48. Perteguer, M. J., Cuéllara, C., Guilléna, J. L., Águilab, C., Fenoyb, S., Chivatoc, T & Lagunac, R. (2003). *Cross-reactivity between Anisakis simplex sensitization and visceral larva migrans by Toxocara canis*. Elsevier. Acta Tropica. Vol 89(1): pp 85-89.
49. Ponce, M., Martínez M. N., Caballero, S., Rodríguez, A & De la Rosa, J. L. (2014). *Toxocariosis*. En Becerril, MA. (2014). *Parasitología médica*. Mc Graw Hill Education. México. Cuarta edición. Capítulo 32: pp 279-287.
50. Ponce de León, P., Foresto, P & Valverde, J. (2010). *Ascaris lumbricoides: Mimetismo molecular por absorción de epítotos P1*. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. Vol 44 (2): pp 253-257. Recuperado en 06 de octubre del 2019 de en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53516752008>
51. Pottinger. P & Charles R. (2014). *Pathogenic Parasites*. En Ryan, K. J., Ray, C. G., Ahmad, N., Drew, W. Lagunoff, M., Pttinger, P., Reller, L. B & Sterling, C. R. *Sherris Medical Microbiology*. Mc Graw Hill Education. Sexta Edición. Part 5. Capítulo 55: pp 863-866.
52. Relly, D. O., Miña, L., Pérez, Z., García, C & Menéndez, Y. (2018). *Toxocariasis ocular. A propósito de un caso*. Revista Médica Electrónica. Vol 40(6): pp 2097-2107.
53. Resende, N. M., Gazzinelli, P. H., Barbosa, F. S., Oliveira, L. M., Nogueira, D. S., Gazzinelli, A. C., Gonçalves, M. T. P., Amorim, C. C. O., Oliveira, F. M. S., Caliari, M. V., Rachid, M. A. Volpato, G. T., Bueno, L. L., Geiger, S. M & Fujiwara, R. T. (2015). *New insights into the immunopathology of early Toxocara canis infection in mice*. Parasit Vectors. Vol 8: p 354.
54. Robertson, B. D., Burkot, T. R., Gillespie, S. H., Kennedy, M. W., Wambai, Z & Maizels R. M. (1988). *Detection of circulating parasite antigen and specific antibody in Toxocara canis infections*. Clin. exp. Immunol. Vol 74: pp 236-241.
55. Rodríguez, A., Martínez, M. N., Caballero, S., Rufino, Y & Ponce, M. (2017). *Toxocara canis: Analysis of the kinetics of antigen release and antibody production in an in vivo model for the detection of past or present infection*. Elsevier. Veterinary Parasitology. Vol 243: pp 183-187.
56. Rodríguez, A., Martínez, M. N., Medina, Y., Medina, M. E., Meza A., Correa, D., Caballero, S & Ponce, M. (2015). *Successful capture of Toxocara canis larva antigens from human serum samples*. Parasites Vectors. Vol 8(264).
57. Rojas, A. C., León, M. C & Bustamante, O. R. (2016). *Toxocara canis: una zoonosis frecuente a nivel mundial*. Tunja (Boyacá) – Colombia. Revista Ciencia y Agricultura (Rev Cien Agri). Vol 13 (1): pp. 19-27.
58. Roldán, W. H., Espinoza, Y. A., Huapaya, P. E & Jiménez, S. (2010). *Diagnóstico de la toxocarosis humana*. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica. Vol 27(4): pp 613-620. Recuperado en 14 de septiembre de 2019, de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342010000400019&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342010000400019&lng=es&tlng=es).
59. Santos, L., Donassolo, R. A., Berne, M. E., Leite, F., Avila, L., Scaini, C. J., Moreira, Â. N., & Conceição, F. R. (2019). *The serodiagnostic potential of recombinant proteins TES-30 and TES-120 in an indirect ELISA in the diagnosis of toxocariasis in cattle, horses, and sheep*. PloS one. Vol 14(3): e0213830.
60. Schabussova, I., Amerb, H., Diec, I., PaulKosmab., Maizelsa, R. (2007). *O-Methylated glycans from Toxocara are specific targets for antibody binding in human and animal infections*. Elsevier. International Journal for Parasitology. Vol 37(1): pp 97-109.
61. Serrano, A. (2009). *Células colaboradoras (TH1, TH2, TH17) y reguladoras (Treg, TH3, NKT) en la artritis reumatoide*. Reumatología Clínica. Vol. 5(1); pp 1-5.

62. Sperottoa, R., Schmitt, F., Aires, M. E., Costa, L. F., Silva, L., Mariante, K., Silva, K., Bunselmeyer, H., Bernea, N & Borsuk, S. (2017). *Proteomic analysis of Toxocara canis excretory and secretory (TES) proteins*. Molecular and Biochemical Parasitology. Vol 211: pp 39-47.
63. Steven, F. (2002). *Immunology and evolution of infectious disease*. Princeton University Press. Chapter 4: *Specificity and cross-reactivity*. Recuperado en 10 julio 2019, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2396/>
64. Strube, C., Heuer, L & Janecek, E. (2013). *Toxocara spp. infections in paratenic hosts*. Elsevier. Veterinary Parasitology. Vol 193 (4). pp 375-389.
65. The Center for Food Security and Public Health (CFSPH) & Institute for International Cooperation in Animal Biologist (IICAB). (2005). *Toxocarosis, Larva Migrans Visceral, Larva Migrans Ocular, Granulomatosis parasitaria, Retinitis Toxocara*. Iowa State University: pp 1-7.
66. Theodoridis, T., Frydas, S., papazahariadou, M., Hatzistilianou, M., Adamama-Moraitou, K. K., Di Gioacchino, M & Felaco, M. (2001). *Toxocarosis as zoonosis. A review of literature and the prevalence of toxocara canis antibodies in 511 serum samples*. International journal of immunopathology and pharmacology. Vol. 14(1): pp 17-23.
67. Thomas, D., Jeyathilakan, N., Abdul, S & Senthilkumar, T.M.A. (2016). *In vitro production of Toxocara canis excretory-secretory (TES) antigen*. Springer. Journal of Parasitic Diseases. Vol 40(3): pp 1038–1043.
68. Torres, G. A., Sánchez, I. C., Restrepo, L. P., & Albarracín, W. (2012). *Estudio de la maduración de carne de cordero empleando electroforesis SDS-PAGE*. Revista Colombiana De Química, Vol 41(2): pp 263-282.
69. Uribarren. T. (2018). *Larva migrans visceral*. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Recuperado en 06 de octubre de 2019, de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/larva-migrans-visceral.html>
70. Valdez, F., Hernández, M., Govezensky, T., Frago, G., & Sciuotto, E. (1994). *Immunization against Taenia crassiceps cysticercosis: identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity*. The Journal of parasitology. Vol 80(6): pp 931–936.
71. Yahiro, S., Cain, G & Butler, J. E. (1998). *Identification, characterization and expression of Toxocara canis nematode polyprotein allergen TBA-1*. Parasite Immunology. Vol 20(8): pp 351-357.
72. Zhu, X. Q., Korhonen, K., Cai, H., Young, N. D., Nejsun, P., Himmelstjerna, G. S., Boag, P. R., Tan, P., Li, Q., Min, J., Yang, Y., Wang, X., Fang, X., Hall, R. S., Hofmann, A., Sternberg, P. W., Jex, A. R & Gasser, R. B. (2015). *Genetic blueprint of the zoonotic pathogen Toxocara canis*. Nat Commun. Vol 6: p 6145. Recuperado en 11 de diciembre de 2019, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4327413/>
73. Zibaei, M., Sadjjadi, S. M., Sarkari, B & Uga, S. (2015). *Evaluation of Toxocara cati Excretory–Secretory Larval Antigens in Serodiagnosis of Human Toxocariasis*. Journal of Clinical Laboratory Analysis (JCLA). Vol 30(3). pp 248-253.

## Referencias de imágenes

1. Abou-El-Naga, IF. (2018). *Developmental stages and viability of Toxocara canis eggs outside the host*. Biomédica. Vol. 38: pp 189-97.
2. FaresTaie Instituto de Análisis. (2019). *Zoonosis frecuentes por parásitos helmínticos caninos y felinos*. Portal Veterinaria Argos. Recuperado en 29 Octubre 2019, de <https://www.farestaie.com/novedades/profesionales/842-zoonosis-frecuentes-por-parasitos-helminticos-caninos-y-felinos/>
3. García, A. L. (2018). *“Obtención y evaluación de los productos de excreción-secreción de larvas L2 de Toxocara canis”*. México, CDMX. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
4. Global Health, Division of Parasitic Diseases. (2019). *Parasites-Toxocariasis (also known as roundworm infection)*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Recuperado en 19 de octubre de 2019, de <https://www.cdc.gov/parasites/toxocariasis/index.html>
5. Pal. (2010). *Tu mascota*. Blogger. España. Recuperado en 15 Octubre 2019, de <http://sobretumascota.blogspot.com/2010/10/toxocara-canis.html>
6. Pottinger. P & Charles R. (2014). *Pathogenic Parasites*. En Ryan, K. J., Ray, C. G., Ahmad, N., Drew, W. Lagunoff, M., Pttinger, P., Reller, L. B & Sterling, C. R. *Sherris Medical Microbiology*. Mc Graw Hill Education. Sexta Edición. Part 5. Capítulo 55: pp 863-866.
7. Thomas, D., Jeyathilakan, N., Abdul, S & Senthilkumar, T.M.A. (2016). *In vitro production of Toxocara canis excretory-secretory (TES) antigen*. Springer. Journal of Parasitic Diseases. Vol 40(3): pp 1038–1043.

## Anexos

### Anexo 1: Disoluciones utilizadas durante el desarrollo experimental

#### Disolución crioprotectora

- Mezclar 9 partes de suero fetal bovino descomplementado con 1 parte de dimetilsulfóxido (calidad cultivo celular) estéril, v/v.
- Conservar a 4°C.

#### Disolución amortiguadora de carbonatos 0.1M, pH 9.6

- Pesar 3.18 g de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) y 5.86 g de bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>).
- Disolver los carbonatos en 800 mL de agua bidestilada.
- Ajustar el pH a 9.6 y aforar a 1000 mL.
- Mantener a 4°C.

#### Amortiguador de lavado (PBS-tween 20, 0.05%)

- A un litro de PBS pH 7.2 añadir 500 µL de Tween 20.
- Guardar a 4°C.

#### Disolución de bloqueo de leche descremada al 5%

- Pesar 5 g de leche descremada en polvo.
- Disolver en 100 mL de PBS-Tween.
- Guardar a -20°C.

#### Disolución cromógena/ sustrato para Inmunoelctrotransferencia o WB

- Pesar 30 mg de 3, 3'-Diaminobenzidina.
- Añadir 60 mL de PBS.
- Agregar 6 µL de peróxido de hidrógeno al 30%.

\*La solución se prepara inmediatamente antes de usarla.

#### Amortiguador de muestra para electroforesis

- Medir 4 mL de agua destilada, 1mL de Tris-HCl 0.5M, pH 6.8, 0.8mL de glicerol, 1.6mL de SDS 10%, 0.4 mL de 2-β-mercaptoetanol y 0.2mL de azul de bromofenol 0.05% (p/v).
- Homogeneizar y hacer alícuotas de 1 mL; almacenar congelado.

**Nota:** Se utiliza SDS (duodecil sulfato) que es una sal sódica que se une a las proteínas y les confiere carga negativa, 2-β-mercaptoetanol que reduce cualquier puente disulfuro, glicerol que aumenta la densidad y ayuda a mantener estable la muestra, y azul de bromofenol que es el marcador y tiene movilidad superior a las proteínas de la muestra, se utiliza como marcador del frente de la electroforesis, que en principio garantiza que por detrás se encuentren las proteínas e indica cuando se debe de interrumpir la electroforesis ( Ponce de León, et al 2010).

#### Amortiguador de transferencia (Tris 0.025M, glicina 0.192M, metanol 20% v/v, pH 8.3)

- Medir 12.5 mL de Trizma-base 1.5M, agregar 14.49 g de glicina y añadir 200 mL de metanol.
- Aforar a 1,000 mL con agua bidestilada.
- Guardar a 4°C; el amortiguador se puede usar 3 veces, después de cada uso se filtra con papel Whatman 1.

#### Amortiguador del gel concentrador (Tris-HCl 0.5M pH 6.8)

- Pesar 6.05g de Tris en 85 mL de agua bidestilada.
- Ajustar el pH con HCl 1N hasta 6.8.
- Aforar a 100 mL con agua bidestilada.
- Guardar a 4°C.

#### Amortiguador del gel separador (Tris-Base 1.5M, pH 8.8)

- Disolver 18.17 g de Tris-base (Hidroximetil aminometano) en 85 mL de agua bidestilada.
- Ajustar el pH con HCl concentrado hasta 8.8.
- Aforar a 100 mL con agua bidestilada.
- Guardar a 4°C.

#### **Amortiguador para electroforesis (tris-glicina-SDS) \***

- Medir 200 mL de tris-glicina-SDS 5X\*
- Aforar a 1,000 mL con agua bidestilada.
- Guardar a 4°C.

**Nota:** Este Amortiguador se puede usar 2 o 3 veces en la cámara inferior; después de cada uso se filtra con papel Whatman 1.

#### **\*Tris-glicina-SDS 5X**

- Pesar 15 g de tris-base, 72g de glicina y 5 g de SDS.
- Disolver en 1,000 mL de agua bidestilada.

#### **Azul de Coomassie 0.06% (para la tinción de geles)**

- Pesar 300 mg de azul de Coomassie.
- Añadir 150 mL de metanol al 30% y 50 mL de ácido acético glacial al 10%.
- Aforar a 500 mL con agua bidestilada.
- Guardar en un frasco ámbar y mantener a temperatura ambiente.
- La solución se deja madurar una semana y se filtra a través de papel Whatman 1 antes de usar.

#### **Lauril sulfato de sodio (dodecil sulfato de sodio) SDS 10%**

- Pesar 10 g de SDS y aforar a 100 mL con agua bidestilada.
- Mantener a 4° C hasta su uso.

#### **Medio DEMEN**

- Disolver un sobre de medio DMEN en 800 mL de agua grado Milli-Q.
- Agregar 2 g de bicarbonato de sodio (GIBCO).
- Adicionar 80 mg de gentamicina.
- Ajustar el pH a 7.2 (con NaOH 1N o con HCl 1N).
- Aforar a 1,000 mL con agua grado Milli-Q.
- Esterilizar por filtración en membrana de 0.22 µm.
- Almacenar en frascos estériles y guardar a 4° C.

#### **Solución de cromógeno/sustrato para ELISA**

- Pesar 4 mg de orto-fenilendiamina (OPD).
- Añadir 5 mL de ácido cítrico 0.1M y 5 mL de citrato de sodio 0.1 M.
- Adicionar 4µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%.

**Nota:** Se prepara con antelación.

#### **Disolución decolorante para geles de acrilamida 1 (metanol-ácido acético-agua)**

- Medir 500 mL de metanol absoluto.
- Añadir 100 mL de ácido acético glacial.
- Aforar a 1,000 mL con agua bidestilada.
- Mantener en frasco color ámbar a temperatura ambiente.

#### **Amortiguador de fosfatos 10X**

- Pesar 2.62g de NaH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (fosfato de sodio monobásico monohidratado).
- Pesar 11.5 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (fosfato de sodio dibásico anhidro).
- Disolver en 200 mL de agua bidestilada (calentar un poco hasta disolver los cristales) y aforar a 1,000 mL con agua bidestilada.

#### **Disolución salina de fosfatos (PBS pH7.2, NaCl 0.15M, fosfatos 0.01M)**

- Medir 800 mL de agua destilada.
- Agregar 100 mL de \*PB 10X y 8.75 g de NaCl.
- Disolver las sales y ajustar el pH a 7.2.
- Aforar a 1,000 mL con agua bidestilada.
- Guardar a 4°C.

Anexo 2: Espectros obtenidos por electroforesis SDS-PAGE y Western Blot

Tabla 10. Espectros de cada banda obtenida por electroforesis SDS-PAGE de la Figura 5.

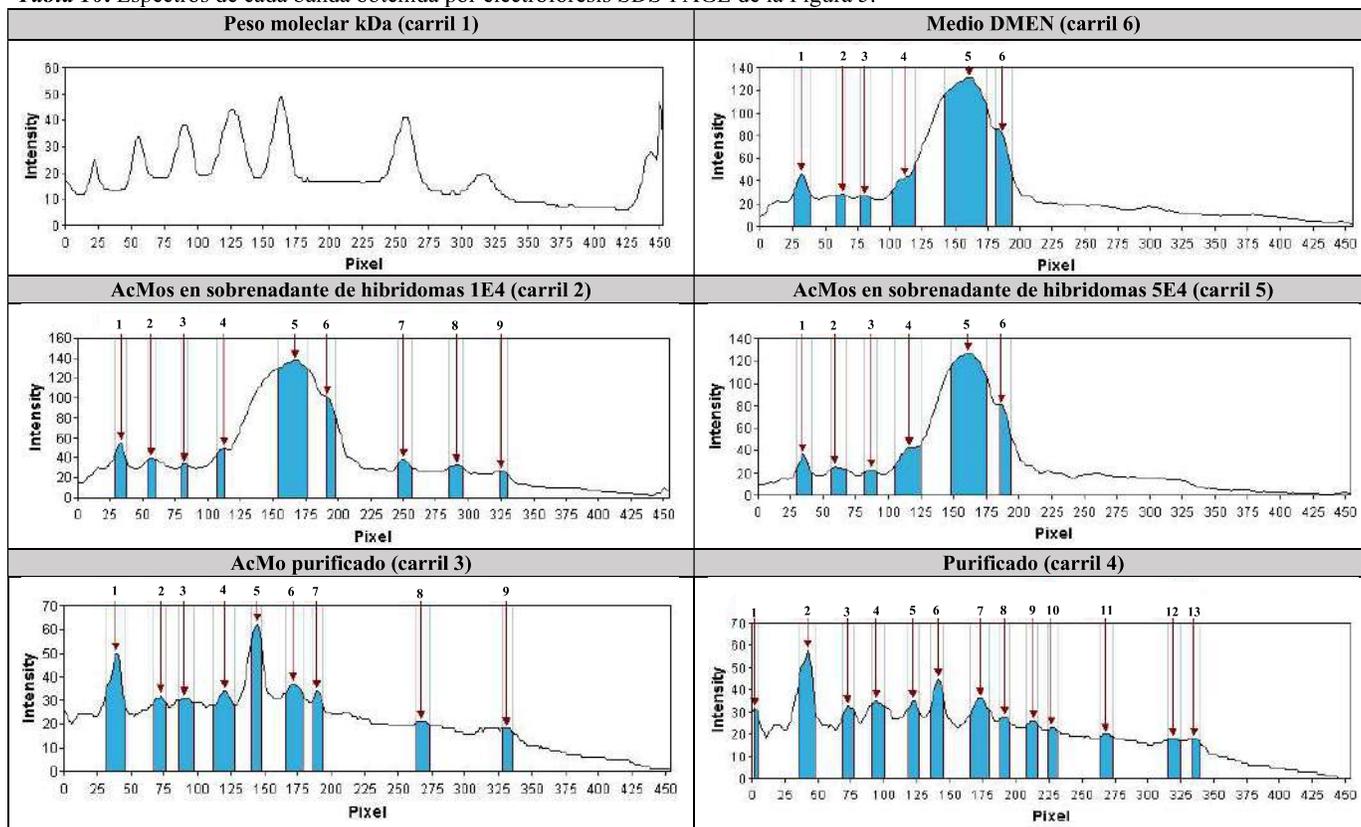
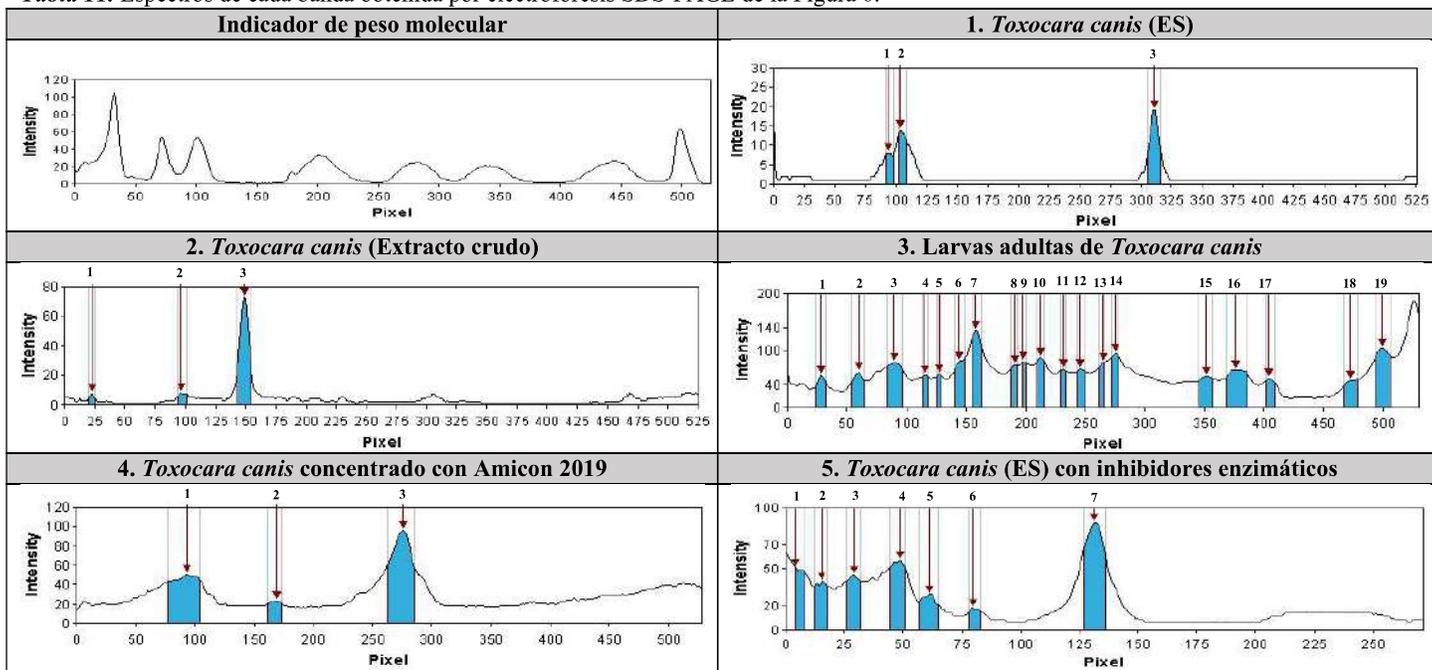


Tabla 11. Espectros de cada banda obtenida por electroforesis SDS-PAGE de la Figura 6.



Continúa ...

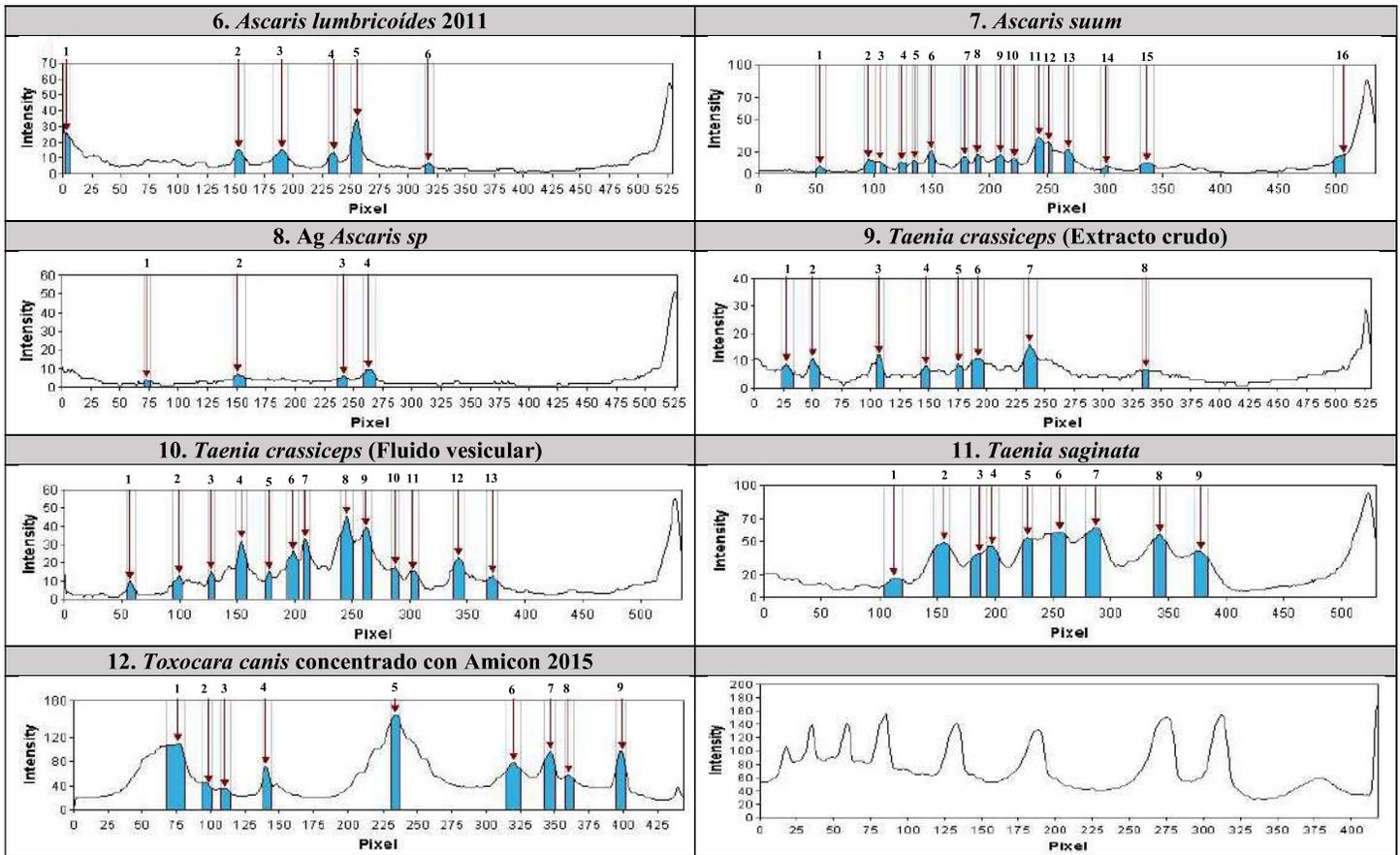
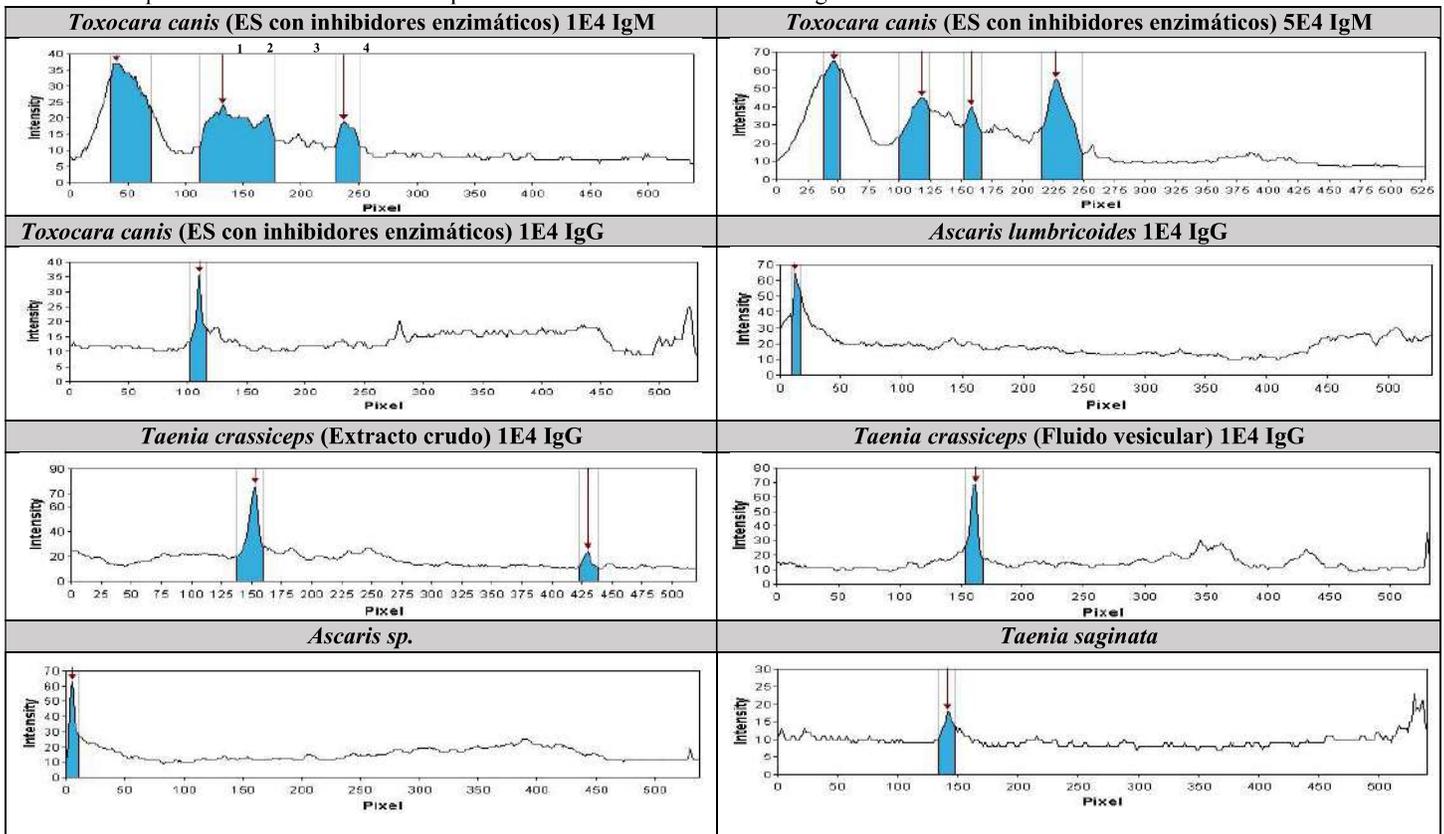
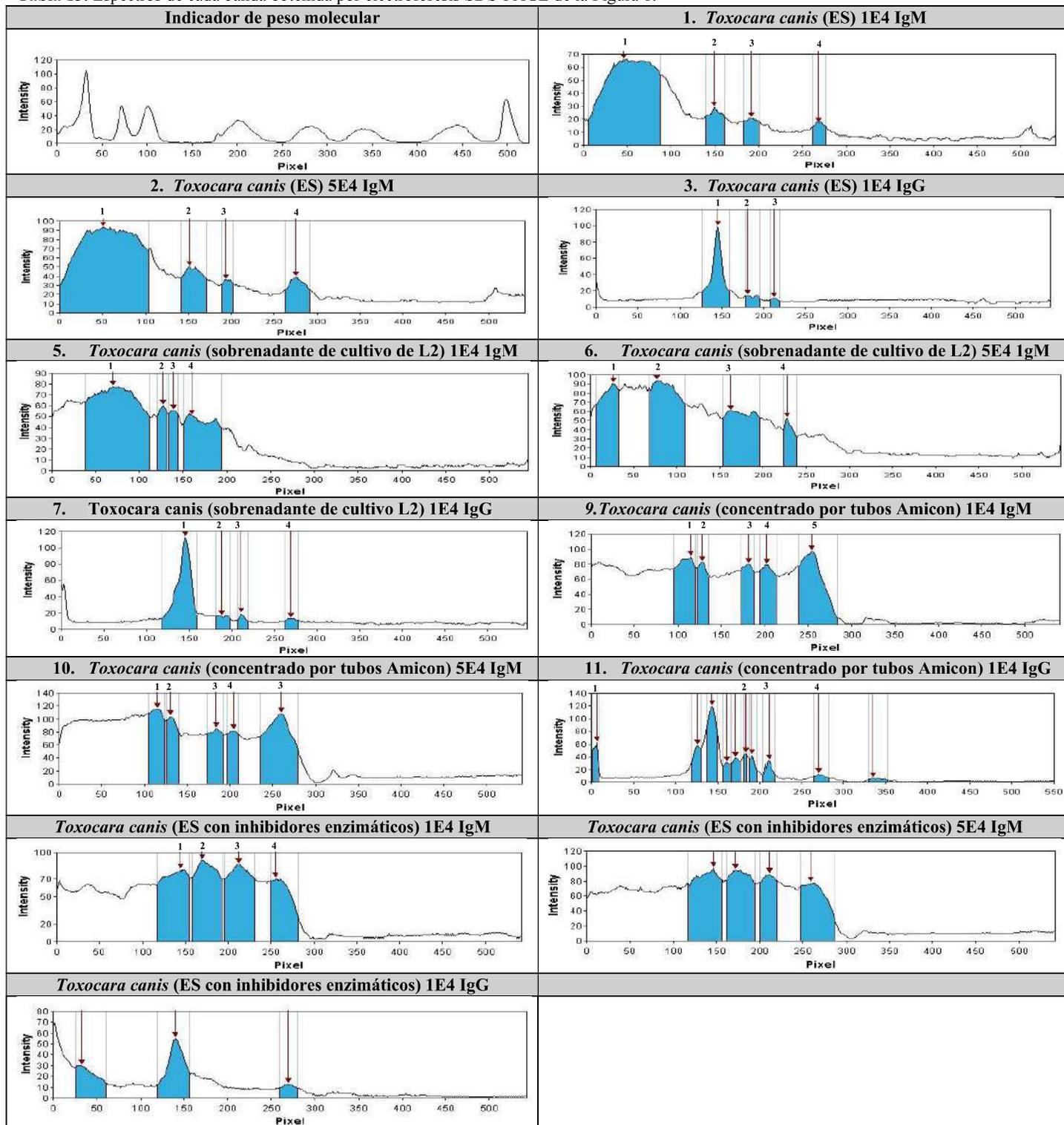


Tabla 12. Espectros de cada banda obtenida por electroforesis SDS-PAGE de la Figura 7.



**Tabla 13.** Espectros de cada banda obtenida por electroforesis SDS-PAGE de la Figura 8.



### Anexo 3: Análisis de varianza

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	25.0109429	30	0.8336981	6.50801362	2.8387E-10	1.64301834
Dentro de los grupos	7.94240533	62	0.12810331			
Total	32.9533483	92				