

## Artículo de Investigación

# Obtención de huevos larvados infectantes de *Toxocara canis* para inoculación de ratones balb/c en estudios experimentales

Obtaining infecting larvated eggs of *Toxocara canis* for inoculation of balb/c mice in experimental studies

<sup>1</sup> Johanmary Gallardo Yáñez, <sup>2</sup> María Dalila Forlano Riera

<sup>1</sup>Área Anatomía de los Animales Domésticos, Decanato Ciencias Veterinarias, Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” (UCLA), Venezuela. Teléfono Área 02512592468e, mail: [jgallardo@ucla.edu.ve](mailto:jgallardo@ucla.edu.ve) ORCID 0003-1216-4320 <sup>2</sup>Unidad de Investigación de Parasitología Veterinaria, Decanato Ciencias Veterinarias, Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”, ORCID 0002-9235-3430.

DOI 10.5281/zenodo.15739395

### RESUMEN

La infección por *Toxocara canis* (*T. canis*) representa una importante zoonosis parasitaria de distribución mundial. El hombre se infecta por la ingestión involuntaria de huevos larvados del parásito. Es importante conocer el comportamiento de *T. canis* en los diferentes órganos del ser humano, mediante la ejecución de estudios experimentales en ratones de la cepa BALB/c, para lo cual se requiere infectarlos con huevos larvados viables del parásito. El objetivo de esta investigación fue obtener huevos larvados infectantes de *Toxocara canis* para la inoculación de ratones BALB/c en estudios experimentales. Se trabajó con 12 hembras adultas de *T. canis*, provenientes de una perra (*Canis lupus familiaris*) cachorra mestiza, con signos clínicos de parasitosis y resultado coprológico positivo a *Toxocara* spp., la cual fue tratada con pamoato de pirantel a una dosis única de 15 mg/kg vía oral. A dichas hembras, se les realizó la disección del útero y se obtuvo un total de 1.200.000 huevos del parásito, que fueron incubados en solución formalina/ringer 2,5% a una temperatura de 25 °C y una humedad de 98% durante 4 semanas, se oxigenaron y monitorearon cada 3 días, observando las diferentes fases de su desarrollo. Desde la primera hasta la última revisión, se encontró una viabilidad de 99 a 99,5% es decir, que sólo 0,5 a 1% del total de huevos, no desarrollaron la forma larvaria. Los huevos larvados infectantes de *T. canis*, representan el factor de riesgo más importante en la transmisión de esta enfermedad.

**Palabras Clave:** *Toxocara*, zoonosis, parásito, huevo, larva.

Recibido: 17-11-22

Aceptado: 15-12-22

## ABSTRACT

Infection with *Toxocara canis* (*T. canis*) represents an important parasitic zoonosis with worldwide distribution. Man becomes infected by involuntarily ingesting larvated eggs of the parasite. It is important to know the behavior of *T. canis* in different human organs, by carrying out experimental studies in mice of the BALB/c strain, for which it is necessary to infect them with viable larvated eggs of the parasite. The objective of this research was to obtain infective larvae eggs of *Toxocara canis* for inoculation of BALB/c mice in experimental studies. We worked with 12 adult females of *T. canis*, from a mixed-breed female dog (*Lupus canis familiaris*) puppy, with clinical signs of parasitosis and a positive coprological result for *Toxocara* spp., which was treated with pyrantel pamoate at a single dose of 15 mg/kg. orally. The uterus was dissected from these females and a total of 1.200.000 eggs of the parasite were obtained, which were incubated in 2.5% formalin/ringer's solution at a temperature of 25 °C and a humidity of 98% for 4 weeks, they were oxygenated and monitored every 3 days, observing the different phases of their development. From the first to the last review, a viability of 99 to 99.5% was found, that is, only 0.5 to 1% of the total eggs did not develop the larval form. The infective larvae eggs of *T. canis* represent the most important risk factor in the transmission of this disease.

**Key words:** *Toxocara*, zoonosis, parasite, egg, larva.

## INTRODUCCIÓN

La infección por *Toxocara canis* (*T. canis*) representa una importante zoonosis parasitaria de distribución mundial, endémica en gran parte de los países de América, África y Asia, específicamente prevalente en zonas tropicales [1,2]. Este helminto afecta a caninos y felinos que actúan como hospedadores definitivos, de igual manera afecta a otras especies animales como ganado, cerdos, roedores, lagomorfos y aves que son hospedadores paraténicos y al ser humano que actúa como un hospedador accidental, siendo este último infectado por la ingestión involuntaria de huevos larvados de *Toxocara* spp. expulsados al ambiente con las heces de hospedadores definitivos parasitados y por la ingestión de larvas ubicadas en hospedadores paraténicos infectados, al consumirlos crudos o poco cocidos [2,3]. Cada hembra de *Toxocara* puede llegar a producir hasta 200.000 huevos por día [4,5], los cuales aparecen en las heces de los perros (*Lupus canis familiaris*) parasitados a las 4-5 semanas post-infección, para luego embrionar en el medio ambiente, en condiciones de humedad y temperatura adecuadas a las 2-3 semanas [6], haciéndose infectantes. Estos huevos larvados de *T. canis*, son muy resistentes a los factores físicos y químicos del ambiente y se ha reportado que pueden mantenerse viables en el suelo por 2 a 4 años o más [3,7], representando un factor de riesgo importante para el ser humano. A pesar de que en el intestino del ser humano no existen las condiciones necesarias para el desarrollo del parásito hasta su fase adulta, las larvas penetran la pared intestinal, llegan a la circulación, se propagan vía sistémica y migran por diversos órganos [8], generando cuatro síndromes clínicos que se han clasificado como: larva *migrans* visceral, larva *migrans* ocular, neurotoxocariosis y toxocariosis encubierta [9], los cuales pueden llegar a afectar gravemente al paciente. Para el diagnóstico definitivo de la infección por *T. canis* en el ser humano, se realiza la detección de las larvas del nematodo en biopsias. Sin embargo, este procedimiento no es de elección por ser extremadamente invasivo y depende de la carga del parásito, su ubicación y la etapa de infección en que se encuentre el paciente [8]. En este caso, la implementación de técnicas de inmunodiagnóstico así como el estudio

clínico y epidemiológico del paciente, constituye un gran apoyo en la determinación de la enfermedad. Es por ello que resulta muy importante conocer el comportamiento del parásito en los diferentes tejidos y órganos del ser humano, lo cual es posible mediante la ejecución de estudios experimentales, principalmente en ratones de la cepa BALB/c. Estos representan el modelo animal idóneo, ya que se ha comprobado que la ruta migratoria de las larvas de *T. canis* y las lesiones que ocasionan en los órganos, son similares a las del ser humano; asimismo, la cepa en particular tolera infecciones masivas por el nematodo durante periodos prolongados, lo que permite una mejor comprensión de las relaciones parásito-hospedador en la toxocariosis humana [10,11,12]. Para poder ejecutar dichos estudios, es necesario infectar experimentalmente a los ratones con huevos larvados viables del parásito, de allí la importancia de realizar la presente investigación en la cual se estableció como objetivo principal, obtener huevos larvados infectantes de *Toxocara canis* para la inoculación de ratones BALB/c en estudios experimentales.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Esta investigación se llevó a cabo en la Unidad de Investigación de Parasitología Veterinaria, perteneciente al Decanato de Ciencias Veterinarias de la UCLA, Venezuela. Se obtuvo los parásitos adultos de *Toxocara* spp. de una perra (*Canis Lupus Familiaris*) mestiza de 3 meses de edad, con signos clínicos de parasitosis (ascitis, emaciación, mucosas pálidas, diarrea) y resultado positivo por coprología a *Toxocara* spp. La paciente fue tratada con pamoato de pirantel a una dosis única de 15 mg/kg [13,14,15]. Este fármaco no es vermífugo ni ovicida, solo ocasiona bloqueo neuromuscular [16], lo cual permitió obtener ejemplares viables del nematodo (Figura 1), que fueron recolectados de las heces defecadas por la perra. Estos parásitos se lavaron cuidadosamente y se acondicionaron en envases de vidrio con solución azucarada a temperatura ambiente y fueron trasladados inmediatamente a la Unidad de Investigación de Parasitología Veterinaria de la UCLA, donde se procedió a su identificación morfológica y morfométrica con una lupa estereoscópica (Marca Nikon SMZ645) y la ayuda de un Médico Veterinario

Parasitólogo. Se reconocieron 5 machos adultos de *Toxocara* spp., 4 hembras adultas de *Toxocara cati* (*T. cati*) y 12 hembras adultas de *Toxocara canis* (*T. canis*), las cuales midieron entre 12 y 14 cm de longitud. Una vez identificadas las hembras de *T. canis*, se extrajeron los huevos de ellas mediante la disección del útero, realizada por un Médico Veterinario Parasitólogo (Figura 2) y se colocaron en tubos donde se concentraron por centrifugación a 1.500 rpm durante 5 minutos [17]; 200 µl de pellet, que contenía los huevos a una concentración promedio de 1.000 huevos por cada µl, fueron transferidos a cada una de las 6 cápsulas de Petri empleadas con 20 ml de solución formalina/ringer 2,5% y se mantuvieron a 25 °C y 98% de humedad durante 4 semanas [18]. Dichos huevos se oxigenaron y monitorearon cada 3 días con ayuda del microscopio óptico (Marca Olympus CX21), determinándose mediante observación las características presentes durante las diferentes fases de su desarrollo (huevos con una célula, con mórulas y con larvas) (Figura 3) [17]. Durante la segunda y cuarta semana de incubación, se realizó una técnica especial para poder efectuar la medición de las larvas de *T. canis*, en la que se mezcló 0,5 ml de la solución con huevos y 0,5 ml de hipoclorito de sodio (5%), se dejó reposar dicha mezcla 5 minutos, se procedió a lavarla dos veces con agua bi-destilada mediante centrifugación y luego se mezcló en el vortex [19], logrando que las larvas salieran de los huevos para medirlas, utilizando el ocular micrométrico del microscopio óptico (Marca Olympus CX21). Durante la cuarta semana, cuando alcanzaron una medida óptima para considerarse infectantes (Figura 4), se procedió a conservar los huevos larvados en tubos Eppendorf a 4°C [20], quedando en promedio 1.000 huevos en cada tubo, los cuales fueron previamente tomados de las cápsulas de Petri, lavados tres veces con cloruro de sodio, recolectados por centrifugación (2000 rpm durante 3 minutos) y contados en cámara de Neubauer [21]. De esta manera, los huevos larvados infectantes de *T. canis* pueden permanecer refrigerados, hasta el momento en que van a ser empleados para la inoculación respectiva de los ratones.

## RESULTADOS

De cada una de las 12 hembras adultas de *Toxocara canis* (*T. canis*), se extrajeron en promedio 100.000 huevos, lo que indica que se obtuvo aproximadamente 1.200.000 huevos del parásito. Desde la primera hasta la última revisión de ellos, se encontró una viabilidad de 99 a 99,5% (Figura 5), ya que sólo 0,5 a 1% del total, no desarrollaron la forma larvaria. En la primera semana de incubación, ya se observaban larvas con movimiento en el interior de los huevos y sus cápsulas estaban en buen estado. Durante la segunda semana de incubación, se observó un movimiento normal de las larvas, pero las mediciones indicaron que aún no habían completado su desarrollo. En la cuarta semana las larvas presentaron movimientos normales y se constató que en promedio alcanzaron una longitud de 410  $\mu$ , lo que demostraba que habían completado su desarrollo y eran infectantes.

## DISCUSIÓN

Debido a que la toxocariosis es una de las principales enfermedades parasitarias, zoonóticas y tropicales desatendidas a nivel mundial, con un impacto socioeconómico significativo y causante de enfermedad grave en los seres humanos [22, 23], es muy importante la ejecución de investigaciones que contribuyan a nuevos conocimientos relacionados con el comportamiento de *Toxocara canis* (*T.canis*) en el humano, desde el momento en que el huevo es expulsado del parásito adulto, hasta que ingresa al organismo de su hospedador y la larva lleva a cabo su migración en él. Una de las características que aumenta el riesgo potencial de infección por este nematodo, es la alta fecundidad de la hembra adulta de *T. canis*, que puede llegar a producir hasta 200.000 huevos al día [5]; hecho confirmado en el presente estudio, ya que de cada una de las 12 hembras adultas encontradas, se obtuvo un promedio de 100.000 huevos al momento de la extracción por disección uterina, para un total de 1.200.000 huevos aproximadamente, con una viabilidad de 99 a 99,5%. Este valor es similar al obtenido por otro autor, quien encontró en su trabajo una viabilidad de 84,7% el día 30 de la incubación de huevos de *T. canis*, sin diferencias significativas en el

transcurso del tiempo evaluado [24]; ambos valores, demuestran la gran resistencia que tienen estos huevos en el ambiente, ya sea artificial como el empleado en dichas investigaciones o natural donde requieren alrededor de una semana (más en temperaturas muy bajas) para embrionar, conservando su potencial infeccioso durante varios años [25], lo que asegura la exitosa continuidad del ciclo biológico del parásito e incrementa aún más ese riesgo de infección en el ser humano.

### **CONCLUSIONES**

Los huevos larvados infectantes de *Toxocara canis*, representan el factor de riesgo más importante en la transmisión de esta enfermedad. Su gran resistencia a factores externos le permite desarrollarse hasta su estadio infectante y permanecer así durante varios años en ambientes naturales o artificiales. Esto se confirmó al obtener 1.200.000 huevos de 12 hembras adultas del nematodo, los cuales presentaron un porcentaje de viabilidad de 99-99,5%. Dicha característica contribuye a poder emplearlos en la ejecución de estudios experimentales, que a su vez permiten incrementar los conocimientos acerca del comportamiento del parásito en el ser humano afectado; lo que, sin duda, tiene un gran valor para el diagnóstico y tratamiento correcto de la enfermedad.

### **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT), por el apoyo para la ejecución de este proyecto y a la Unidad de Investigación de Parasitología Veterinaria del DCV-UCLA, por su apoyo en el desarrollo de la fase experimental.

### **BIBLIOGRAFÍA**

[1] Delgado O, Rodríguez A. Aspectos clínico-epidemiológicos de la toxocariasis: una enfermedad desatendida en Venezuela y América Latina. Boletín de Malariología y Salud Ambiental 2009; 49(1):1-33.

- [2] McGuinness S, Leder, K. Global Burden of Toxocariasis: A Common Neglected Infection of Poverty. *Current Tropical Medicine Reports* 2014; 1(1):52-61.
- [3] Macpherson, C. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: A zoonosis of global importance. *International Journal for Parasitology* 2013; 43(2013):999-1008.
- [4] Pinelli E, Aranzamendi C. *Toxocara* infection and its Association with Allergic Manifestations. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders – Drug Targets* 2012; 12:33-44.
- [5] Strube C, Heuer L, Janecek E. *Toxocara* spp infections in paratenic hosts *Veterinary Parasitology* 2013; 193(2013):375-389.
- [6] Quiroz, H. *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. Grupo Noriega Editores México, DF. 2000.
- [7] Romero C, Yañez S, Mendoza G, Bustamante L, Ramírez N. Contaminación y viabilidad de huevos de *Toxocara* spp. en suelo y heces colectadas en parques públicos, calles y perros en Toluca, México. *Revista Científica, FCV-LUZ* 2013; 23(6):475-479.
- [8] García G, De Lima P, Mendonca M, Nunes A, McBride A, Scaini C. Human toxocariasis: current advances in diagnostics, treatment, and interventions. *Trends in Parasitology* 2014a; 30(9):456-464.
- [9] Acha P, Szyfres B. *Zoonosis: Enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 3 ed. Organización Panamericana de la Salud Washington, DC. 2003.
- [10] Camparoto M.L, Fulan B, Colli C.M, Paludo M.L, Falavigna-Guilherme A.L, Fernandez, M.A. Initial stage of development and migratory behavior of *Toxocara canis* larvae in BALB/c mouse experimental model. *Genetics and Molecular Research* 2008; 7(2):444-450.
- [11] Arroyo V, Siccha K, Terán V, Zafra L, Zeña L, Jara C. Efecto del extracto hidroalcohólico de *Coriandrum sativum* (Apiaceae) sobre la infectividad de huevos embrionados de *Toxocara canis* en *Mus musculus* BALB/c. REBIOLEST. *Revista Científica de Estudiantes* 2013; 1(1):37-42.
- [12] Rodrigues G, Vieira S, Chieffi P, Martins F, Borges R, Zevallos S. Experimental Toxocariasis in BALB/c mice: relationship between parasite inoculum and the IgG immune response. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* 2017; 112(5):382-386.

- [13] Schoenardie E, Scaini C, Pepe M, Borsuk S, Da Costa L, Villela, M. Vertical transmission of *Toxocara canis* in successive generations of mice. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal 2013; 22(4):623-626.
- [14] Dutra G.F, Franca N.S, Da Costa L.F, Dutra P.C, Telmo P.L, Rodrigues L.H. Risk of infection by the consumption of liver of chickens inoculated with low doses of *Toxocara canis* eggs. *Veterinary Parasitology* 2014; 203:87–90
- [15] Telmo P.L, Avila L.F.C, Santos C.A, Aguiar P.S, Martins L.H.R, Berne M.E.A. Elevated trans-mammary transmission of *Toxocara canis* larvae in BALB/c mice. *Revista del Instituto Medico Tropical de Sao Paulo* 2015; 57(1):85-87.
- [16] Brunton L, Lazo J, Parker, K. Goodman y Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 11 ed. McGraw-Hill Interamericana Mexico, D.F. 2007.
- [17] Lescano S, Santos S, Queiroz M, Castro J, Chieffi P. Migration routes of *Toxocara canis* and *Toxocara cati* in tissues of experimentally infected *Rattus norvegicus*. *Neotropical Helminthology* 2013; 7(1):149-153.
- [18] Zibaei M, Sadjjadi SM, Jahadi SH, Sarkari B. A Method for Accelerating the Maturation of *Toxocara cati* Eggs. *Iranian Journal Parasitology* 2007; 2(1):39-42
- [19] Sariego I, Pino A, Scull R, Cuéllar A, Fernández A, Rojas L. Actividad toxocaricida de plantas cubanas. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 2015; 67(3):1-10.
- [20] Nassef N, El-Kersh W, El-Nahas N, Shams El-Din S, Oshiba S, Nosseir M. Parasitological, histopathological, and immunohistochemical assessment of nitric oxide synthase inhibitor: aminoguanidine versus albendazole in the treatment of experimental murine toxocariasis. *Menoufia Medical Journal* 2014; 27:103–114.
- [21] Santarém V, Silva C, Magosso L, Cavalcante L, Rubinsky G, Laposy C. Detection of larvae of *Toxocara canis* in milk: an experimental study in rabbits. *Ciencias Agrarias, Londrina* 2014; 35(1):357-364.
- [22] Chen J, Liu Q, Liu G, Zheng W, Hong S, Sugiyama H. Toxocariasis: a silent threat with a progressive public health impact. *Infectious Diseases of Poverty* 2018; 7(59):1-13.
- [23] Maleki B, Khorshidi A, Gorgipour M, Mirzapour A, Majidani H, Foroutan M. Prevalence of *Toxocara* spp. Eggs in soil of public areas in Iran: A systematic review and meta-analysis. *Alexandria Journal of Medicine* 2018; 54:97-101
- [24] Abou-El-Naga, I. Developmental stages and viability of *Toxocara canis* eggs outside the host. *Biomédica* 2018; 38(2):1-26.

Obtención de huevos de *t. canis* para inoculación experimental

[25] Baalbaki M, El Najjar M, Atweh S, El Ayoubi N. *Toxocara* infection in the differential diagnosis of multiple sclerosis in the Middle East. Multiple Sclerosis Journal-Experimental, Translational and Clinical. Enero-Marzo 2020; (2020):1-10.

### ANEXOS



Figura 1. Ejemplares adultos de *Toxocara* spp.



**Figura 2. Útero (↓) de hembra de *Toxocara canis* con huevos (↑) en su interior; izquierda lupa estereoscópica, derecha microscopio óptico; 40X**



**Figura 3. Huevos de *Toxocara canis* con diferentes formas evolutivas. Con una célula (↑), con mórulas (↓) y con larva (→); 10X**

Obtención de huevos de *t. canis* para inoculación experimental

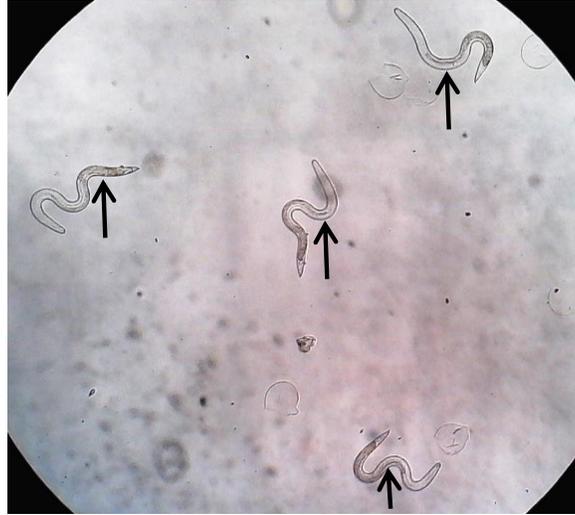


Figura 4. Larvas infectantes de *Toxocara canis* (↑); 10X

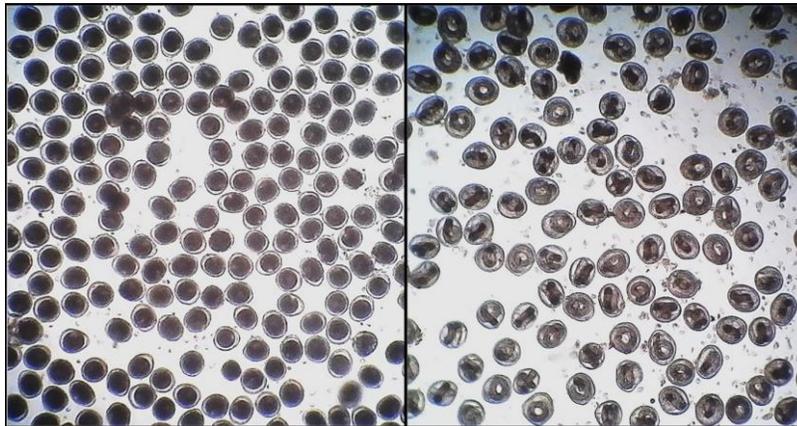


Figura 5. Huevos de *Toxocara canis* extraídos del útero; Izquierda, día 1 de incubación. Derecha, día 30 de incubación; 10X