



REVISTA SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGROECOLÓGICOS



Seguridad biológica y ensayo *in vitro* de expresión génica en PBMC de caninos vacunados experimentalmente contra *Toxocara canis*

Biological safety and *in vitro* gene expression assay in PBMC of canines experimentally vaccinated against *Toxocara canis*

Segurança biológica e ensaio *in vitro* de expressão gênica em PBMC de caninos vacinados experimentalmente contra *Toxocara canis*

Jaramillo-Hernández Dumar A.¹, Lesmes-Rodríguez Lida Carolina², Alcântara-Neves Neuza Maria³

¹ MVZ., Esp., MSc., PhD. Escuela de Ciencias Animales, Universidad de los Llanos. Km 12 vía Puerto López, Villavicencio, Colombia. *Académico correspondiente de la Academia Colombiana de Ciencias Veterinarias.

² MSc. Departamento de Biología & Química, Universidad de los Llanos. Km 12 vía Puerto López, Villavicencio Colombia.

³ MD., MSc., PhD. Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia. Av. Reitor Miguel Calmon, s/n - Canela, Salvador, Brazil.

Autor de correspondencia: dumar.jaramillo@unillanos.edu.co

Recibido 24 de Abril 2023, aceptado 02 de Agosto 2023

RESUMEN

La toxocariasis es una zoonosis desatendida de alta prevalencia e impacto en la salud pública de poblaciones empobrecidas del mundo, su agente causal es el nematodo del género *Toxocara*. Actualmente se utilizan antiparasitarios de amplio espectro para afrontar la enfermedad, sin embargo, no existe una vacuna para prevenirla. El objetivo de esta investigación fue evaluar la seguridad biológica de ensayos clínicos de la vacuna para *Toxocara* spp. en cachorros caninos libres y

parasitados natural y experimentalmente con *Toxocara* spp. Para ello, se utilizaron las proteínas recombinantes rTcVcan y rTcCad de *Toxocara canis*, con las cuales se inmunizaron a 24 cachorros caninos; se evaluó parámetros hemáticos (hemograma, leucograma y plaquetograma) y bioquímica sanguínea de función renal y hepática; además la respuesta *in vitro* de PBMC de los caninos vacunados, a través del ensayo de expresión génica RT-qPCR de citocinas las IL-5, IL- 6, IL-17A, IL-10, factor de necrosis tumoral (TNF- α) e interferón (IFN)- γ . Como resultado, entre los caninos vacunados y el grupo control no se observaron diferencias respecto a los rangos de referencia para hematología en cachorros caninos; de la misma forma para las funciones renal y hepática; en los ensayos de expresión génica en PBMC, las citocinas no presentaron resultados estadísticamente significativos. En conclusión, las formulaciones aplicadas no representaron asociaciones tóxicas y no tuvieron efectos adversos en los animales experimentales, los ensayos de expresión génica en PBMC de los cachorros vacunados con la proteína recombinante rTcVcan de *T. canis* no presentaron resultados concluyentes para evidenciar el tipo de respuesta inmunológica (1, 2 o 3) inducida en los cachorros protegidos mediante la vacunación contra la infección por *Toxocara* spp., según expresión de las citocinas medidas.

Palabras claves: Toxocariasis, vacunología inversa, proteína recombinante, PBMC.

ABSTRACT

Toxocariasis is a neglected zoonosis of high prevalence and impact on the public health of impoverished populations of the world, its causal agent is the nematode of the genus *Toxocara*. Broad-spectrum antiparasitics are currently used to deal with the disease, however, there is no vaccine to prevent it. The aim of this research was to evaluate the biological safety of clinical trials of the vaccine against *Toxocara* spp. in free canine puppies and naturally and experimentally parasitized with *Toxocara* spp. For this, the recombinant proteins rTcVcan and rTcCad from *Toxocara canis*

were used, with which 24 puppies were immunized; hematic parameters (complete blood count, leukogram, and platelet count) and blood biochemistry of kidney and hepatic function were evaluated. In addition, the *in vitro* response of PBMC of vaccinated canines, through the RT-qPCR gene expression assay of cytokines IL-5, IL-6, IL-17A, IL-10, TNF- α and IFN- γ . As a result, between the vaccinated canines and the control group, no differences were observed with respect to the reference ranges for hematology in puppies; in the same way for kidney and hepatic functions; in the gene expression assays in PBMC, the cytokines did not present statistically significant results. In conclusion, the applied formulations did not represent toxic associations and had no adverse effects in experimental animals, and gene expression assays in PBMC of puppies vaccinated with the recombinant protein rTcVcan de *T. canis* did not present conclusive results to demonstrate the type of immune response (1, 2 or 3) induced in puppies protected by vaccination against infection by *Toxocara* spp., according to the expression of the measured cytokines.

Keywords: Toxocariasis, reverse vaccinology, recombinant protein, PBMC.

RESUMO

A toxocaríase é uma zoonose negligenciada de alta prevalência e impacto na saúde pública de populações empobrecidas do mundo, seu agente causal é o nematóide do gênero *Toxocara*. Atualmente, antiparasitários de amplo espectro são usados para tratar a doença, porém, não existe vacina para preveni-la. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a segurança biológica dos ensaios clínicos da vacina contra *Toxocara* spp. em filhotes caninos parasitados natural e experimentalmente com *Toxocara* spp. Para isso foram utilizadas as proteínas recombinantes rTcVcan e rTcCad de *Toxocara canis*, com as quais foram imunizados 24 filhotes caninos. Foram avaliados parâmetros hemáticos (hemograma completo, leucograma e contagem de plaquetas) e bioquímica sanguínea da função renal e hepática; além disso, foi avaliada a resposta *in vitro* de PBMC de caninos vacinados, através do ensaio de expressão gênica RT-qPCR das citocinas IL-5, IL-6, IL-17A, IL-10, TNF-

α e IFN- γ . Como resultado, entre os caninos vacinados e o grupo controle, não foram observadas diferenças em relação aos intervalos de referência para hematologia em filhotes caninos; da mesma forma para as funções renais e hepáticas; nos ensaios de expressão gênica em PBMC, as citocinas não apresentaram resultados estatisticamente significativos. Concluindo, as formulações aplicadas não representaram associações tóxicas e não tiveram efeitos adversos em animais experimentais, ensaios de expressão gênica em PBMC de filhotes vacinados com a proteína recombinante rTcVcan de *T. canis* não apresentou resultados conclusivos para demonstrar o tipo de resposta imune (1, 2 ou 3) induzida em filhotes protegidos por vacinação contra infecção por *Toxocara* spp., de acordo com a expressão das citocinas dosadas.

Palavras-chave: Toxocaríase, vacinologia reversa, proteína recombinante, PBMC.

INTRODUCCIÓN

La toxocariasis es una zoonosis de alta prevalencia e impacto en la salud pública en el mundo, causada por nematodos del género *Toxocara* (*T.*), donde *T. canis* Wener (1792) y *T. cati* Schrank (1788) son los agentes infecciosos más importantes en esta patología (Despommier, 2003). Estos nematodos parasitan a sus hospedadores definitivos, caninos y felinos, respectivamente, cumpliendo su ciclo de vida y logrando expulsar en las heces, de estos, cientos de huevos no embrionados, que en pocas semanas, dependiendo de las condiciones ambientales, pueden desarrollar estadios larvales infectivos (embrionados); contaminando el ambiente donde viven y promoviendo la posibilidad de infección de otros hospederos, tanto definitivos (p. ej., caninos sinantrópicos) como paraténicos (p. ej., humanos) (Macpherson, 2013).

En humanos, la toxocariasis se asocia a una variedad de síndromes, dada la imposibilidad de la larva migratoria de regresar al intestino y completar su ciclo de vida, generando una respuesta inflamatoria según el órgano afectado por su proceso migratorio alterado (Chen et al., 2012). Los síntomas en humanos

asociados con estos síndromes extraintestinales causados por *Toxocara* spp. son inespecíficos a asintomáticos, y requieren seguimiento de laboratorio para su diagnóstico (Fillaux & Magnaval, 2013). Esta situación convierte a la toxocariasis en una patología infradiagnósticada con valores epidemiológicos subestimados asociados a la estimación del impacto real de esta patología en la salud pública mundial (Rubinsky-Elefant et al., 2004).

Para el año 2050, la toxocariasis sería considerada la principal zoonosis desatendida asociada a las geohelmintiasis en el mundo (Rostami et al., 2019). En los Estados Unidos de América es la enfermedad zoonótica parasitaria más frecuente en poblaciones empobrecidas (Ma et al., 2018). Según la OMS (2020) en su libro "*Ending the Neglect to Alcanze the Sustainable Development Goals A Road Map for Unlocked Tropical Diseases 2021-2030*", uno de sus principales objetivos es controlar las geohelmintiasis, especialmente la toxocariasis, dada su impacto relevante en la salud de las personas de escasos recursos económicos en muchos países del mundo.

En América Latina, la toxocariasis es igualmente una de las enfermedades infecciosas desatendidas más frecuente. En el continente se han llevado a cabo diversos estudios epidemiológicos de esta enfermedad. Con referencia a prevalencias en caninos, en Brasil con una muestra de 38940 animales incluyendo perros de varios estados del país, se halló una prevalencia del 11.4% (Dantas-Torres, 2020). Por su parte en la Isla de Granada (Antillas) se determinó una prevalencia de 48.0% en una muestra de 306 perros (Schwartz et al., 2022). En la Paz (Bolivia), durante la temporada seca se halló una prevalencia de 30.3% y de 41.7% durante la temporada húmeda (Llanos et al., 2010). En Barranquilla (Colombia) 12.4% entre 925 caninos (Sarmineto-Rubiano et al., 2018). En Santiago (Chile) 9.1% utilizando una muestra de 582 (Gorman et al., 2006) y en Puno (Perú) 49.3% entre 150 caninos (de Díaz & Anccasi, 2013).

Los caninos como mascotas, especialmente los cachorros actúan como reservorios potenciales de *Toxocara* sp., permitiendo su transmisión a humanos, por esta razón, el Consejo de Parásitos de los Animales de Compañía (CAPC) recomienda que se desparasiten los cachorros a partir de los 15 días de edad, utilizando antiparasitarios de amplio espectro hasta los 6 meses de edad (CAPC, 2016). No obstante, *Toxocara* sp, puede llegar a desarrollar resistencia a los antiparasitarios utilizados para su control (Bowman et al., 2014). Por esta razón y con la finalidad de evitar la infección en humanos, el desarrollo de vacunas de última generación en caninos es de vital importancia (Maizels et al., 2016). Mediante vacunología inversa, nuestro grupo de investigación ha identificado dos proteínas (rTcVcan y rTcCad) candidatas para elaborar una vacuna en caninos (Salazar et al., 2020). Este estudio permitiría generar nuevos antígenos vacunales potenciados mediante el uso de adyuvantes de última generación, fortaleciendo de esta forma el control integrado de una de las enfermedades parasitarias zoonóticas desatendidas más importantes a nivel mundial (Jaramillo-Hernández et al., 2020).

El objetivo de esta investigación fue evaluar la seguridad biológica de ensayos clínicos de la vacuna para *Toxocara* spp. en cachorros caninos libres, y parasitados natural y experimentalmente con *Toxocara* spp., así mismo, evaluar la respuesta *in vitro* de PBMC de estos caninos, a través de RT-qPCR para medir la expresión génica de las citocinas IL-5, IL- 6, IL-17A, IL-10, TNF- α e IFN- γ .

METODOLOGÍA

Caninos vacunados experimentalmente contra *Toxocara canis*

Los experimentos exhibidos en el presente estudio se llevaron a cabo a partir del trabajo de investigación de Jaramillo-Hernández et al. (2022) donde se realizó inmunoprofilaxis e inmunoterapia con la fórmula vacunal rTcVcan 25 μ g + Quil-A[®] 100 μ g a los veinticuatro cachorros de 4 camadas (dieciocho cachorros de tres camadas de caninas gestantes inmunizadas contra *T. canis* y seis cachorros de una

canina gestante no inmunizada para asegurar la infección natural transplacentar de *T. canis*).

Dieciocho cachorros de 5 días de edad, de las camadas libres de *Toxocara* spp., se dividieron aleatoriamente en tres grupos experimentales con seis individuos por grupo: I) Grupo control (grupo 1): 3 dosis de 1 mL de solución de NaCl al 0.9%, SC, días 0, 15 y 30. II) Grupo profilaxis (grupo 2): 3 inmunizaciones con 25 µg rTcVcam + Quil-A® 100 µg en Cloruro de Sodio al 0.9% (NaCl al 0.9%), hasta completar 1 mL, SC; días 0, 15 y 30. El día de la última inmunización, los cachorros del grupo 1 y 2 fueron inoculados con 250 huevos embrionados de *T. canis* entregados en 3 mL de NaCl 0.9%, administrados vía oral por cánula oral y monitoreados durante 2 horas, a intervalos de 20 minutos para evaluar la posibilidad de un efecto emético asociado con el procedimiento (Elsemore et al., 2017). III) Grupo de inmunoterapia (grupo 3): alrededor de 1 día de edad, infección experimental con huevos de *T. canis* (siguiendo el mismo protocolo descrito) y 30 días post-infección (PI) los cachorros (30 días de edad) recibirán el mismo calendario de vacunación experimental que el grupo de profilaxis (grupo 2). IV) Infección natural (grupo 4): formado por los seis cachorros de camada no tratada (infección transplacentaría). Este grupo consistió en la infección natural de *T. canis* y fue el grupo control del proceso de obtención de cachorros infectados de *T. canis*. Los cachorros del grupo 4 a los 30 días de edad, recibieron el mismo calendario de vacunación experimental que el grupo de profilaxis (grupo 2).

Se recogieron asépticamente muestras de 10 a 15 mL de sangre por cachorro mediante venopunción braquial en tubos con heparina, 2 días antes de la primera dosis de la vacuna y 60 días después de la última vacunación realizada para la separación de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Seguimiento clínico y paraclínico de los caninos vacunados experimentalmente

Se realizaron hemogramas y análisis bioquímicos de sangre (alanina aminotransferasa - ALT, fosfatasa alcalina - FA, proteína total, globulina, albúmina, creatinina y nitrógeno ureico en sangre - BUN) cada 15 días desde el día 1 hasta el día 135 (4.5 meses de edad). Los cachorros fueron monitoreados clínicamente cada día evaluando su frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, temperatura corporal, pulso, mucosas, hidratación, clasificación de condición corporal. Al finalizar el experimento, todos los cachorros fueron desparasitados asegurando ausencia de infección por *T. canis*.

Cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Las PBMC se aislaron mediante centrifugación en gradiente de concentración siguiendo las recomendaciones del fabricante de Histopaque®-1077 (Sigma, Chemical Co., St. Louis, MO, USA.) con las modificaciones de Valli et al (2010), donde se colocó sangre sin diluir en Histopaque®-1077 (solución 1:1), luego de la centrifugación (400 g por 30 minutos a temperatura ambiente), las células interfaciales fueron aspiradas con una pipeta y lavadas dos veces en PBS estéril, y posteriormente centrifugadas a 300 g por 20 minutos. El sedimento celular resultante se suspendió en un pequeño volumen de PBS y la concentración de células viables se determinó mediante examen microscópico utilizando la exclusión con azul de tripano. Las células se suspendieron en medio RPMI 1640 (Sigma, Chemical Co., St. Louis, MO, USA.) suplementado con glutamina 2 mM, 100 mg/mL de estreptomina, penicilina 100 UI y suero fetal bovino inactivado por calor al 10% (Sigma, Chemical Co., St Louis, MO, USA), buscando una concentración de 1×10^6 PBMC/mL. Las PBMC se cultivaron en placas de poliestireno de 24 pocillos (Nunc, 142485, Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, USA) a 37 °C, 5 % de CO₂ en presencia de 10 µg/mL de fitohemaglutinina (Thermo Fisher Scientific, Eugene, Oregón, USA) como control positivo, 10 µg/mL de productos secretados/excretados de larvas L3 de *T. canis* (TES) y 25 µg/mL de proteína recombinante rTcVcam o para controles no estimulados usando RPMI 1640. Los cultivos fueron estimulados

por cuadruplicado y el contenido completo de un pozo en cada grupo de tratamiento fue aspirado después de 24 y 48 h de incubación.

Ensayo de expresión genética en PBMC

Al final del período de cultivo, las PBMC se separaron del medio de cultivo y se agregaron en RNAlater (Thermo Fisher Scientific, Eugene, Oregon, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante. Las PBMC se almacenaron a -80 °C. El ARN total se extrajo de las muestras utilizando el mini kit PureLink® RNA (Ambion, Life technologies, USA). Las concentraciones de RNA extraído se midieron utilizando el protocolo y reactivos de Qubit™ RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Eugene, Oregon, USA), utilizando el equipo Qubit™ 3.0 Fluometer (Thermo Fisher Scientific, Eugene, Oregon, USA) para su medición.

La síntesis de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) a ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) se realizó utilizando el kit de transcripción inversa TaqMan™ (Thermo Fisher Scientific, USA), de acuerdo con el protocolo del fabricante. La medición del ADNc se realizó con el kit de ensayo Qubit™ ds DNA HS (Thermo Fisher Scientific, Eugene, Oregon, USA). La expresión de ADNc para la detección indirecta de niveles de ARNm de las citocinas a evaluar, se realizó utilizando el protocolo y reactivos de TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA), así medir la expresión génica de las citocinas IL-5 (NM_001006950.1), IL-6 (NM_001003301.1), IL-17A (NM_001165878.1), IL-10 (NM_001003077.1), TNF- α (NM_001003244.4) e IFN- γ (NM_001003174.1) (Tabla 1), utilizando la técnica de RT-PCR con primers y sondas TaqMan (Thermo Fisher Scientific, USA). Como gen de referencia en caninos se usó ACTB (NM_001003174.1). Se utilizó un volumen de reacción de 20 μ L, que incluía 9.6 μ L de ADNc (0.6 ng/mL aproximadamente) y 10.4 μ L de TaqMan™ Fast Advanced Master Mix. Las muestras se amplificaron en una única placa de 96 pozos; en cada placa se incluyó un control negativo. Cada muestra y el control negativo se analizaron por triplicado para cada ejecución. Se calculó el valor del ciclo umbral para cada muestra, determinando el punto en el que la fluorescencia superó el

umbral para normalizar las diferencias en la eficiencia de extracción de muestra o síntesis de ADNc por transcriptasa inversa en el equipo qPCR QuantStudio 12K Flex (Thermo Fisher Scientific, USA).

Tabla 1. Primers utilizados en el ensayo de expresión génica en PBMC de caninos.

Gen	Secuencia del primer (5´- 3´)	Longitud del Amplicón (bp)	Acceso al GenBank
ACTB	F R	171	NM_0011101.3
IFN- γ	F TTCAAAGGAGCATGGATACCA R TTAAGAACTTGCCAAGCATGTC	117	NM_001003174.1
TNF- α	F TGTTGTAGCAAACCCCGAAG R ATCAGCTGGTTGTCTGTCAGCT	75	NM_001003244.4
IL-10	F AATGAAGGACAAGCTGGACAA R TTAAAGTCCTCCAGCAGGGA	89	NM_001003077.1
IL-17A	F ACTCCAGAAGGCCCTCAGATTA R GATTCCAAGGTGAGGTAGATCG	75	NM_001165878.1
IL-6	F GAACTCCCTCTCCACAAGC R TTCTTGTCAAGCAGGTCTCC	68	NM_001003301.1
IL-5	F AGGCAAACACTGAACATTTTC R TCTCCAAAATCTTCCACTAC	124	NM_001006950.1

Fuente: Autores.

Consideraciones éticas

Los animales vinculados en la presente investigación fueron tratados bajo los preceptos de guías internacionales de animales experimentales (NRC, 2011), garantizándoles condiciones de bienestar animal y salvaguardando su integridad según normatividad vigente en el territorio colombiano (Ley 84 de 1989 “Estatuto Nacional de Protección de los Animales”). Los protocolos mencionados en este estudio fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de los Llanos - Colombia, número de aprobación Acta 07 de 21 de agosto de 2019.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Seguridad del ensayo clínico canino

Se evaluó el estado clínico de los animales realizando continuamente controles, como también evaluación de las pruebas hematológicas, además de funciones renales y hepáticas para identificar algún efecto de alteración clínica y paraclínica, debido a las vacunas. Sin embargo, como se observa en la figura 1, los registros hematológicos de los grupos experimentales a lo largo del trabajo, estuvieron dentro de los parámetros de referencia para caninos cachorros; y no hubo diferencias estadísticas entre los grupos experimentales. Igualmente, en el seguimiento de los marcadores químicos de la sangre de los animales, como se observa en la figura 2, se aprecia que los resultados de los grupos experimentales estuvieron dentro de los valores de referencia para la especie y edad; y no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Evidenciando que la formulación vacunal aplicada en los cachorros no representó evento tóxico clínico o subclínico, sin evidencia de efectos adversos, observando los animales clínicamente sanos al finalizar el estudio.

En la figura 1J se observa una tendencia en el aumento de eosinófilos en los animales de los grupos no profilácticos, este resultado puede relacionarse con los mecanismos inmunitarios naturales cuando hay una infección por *T. canis*, respuesta que ha sido observada en modelos *in vitro* e *in situ* (Pinelli & Aranzamendi, 2012; Resende et al., 2015; Ruiz-Manzano et al., 2019; Sugane et al., 1996; Takamoto et al., 1997; Zibaei et al., 2019). Por lo tanto, se recomienda realizar estudios con respecto a la actividad de la citoquina IL-5 en infecciones en huéspedes definitivos, ya que esta atrae y activa los eosinófilos, acción que puede ser determinante en la eliminación de las larvas de *T. canis* (Dubucquoi et al., 1994; Huang & Appleton, 2016; Meeusen & Balic, 2000).

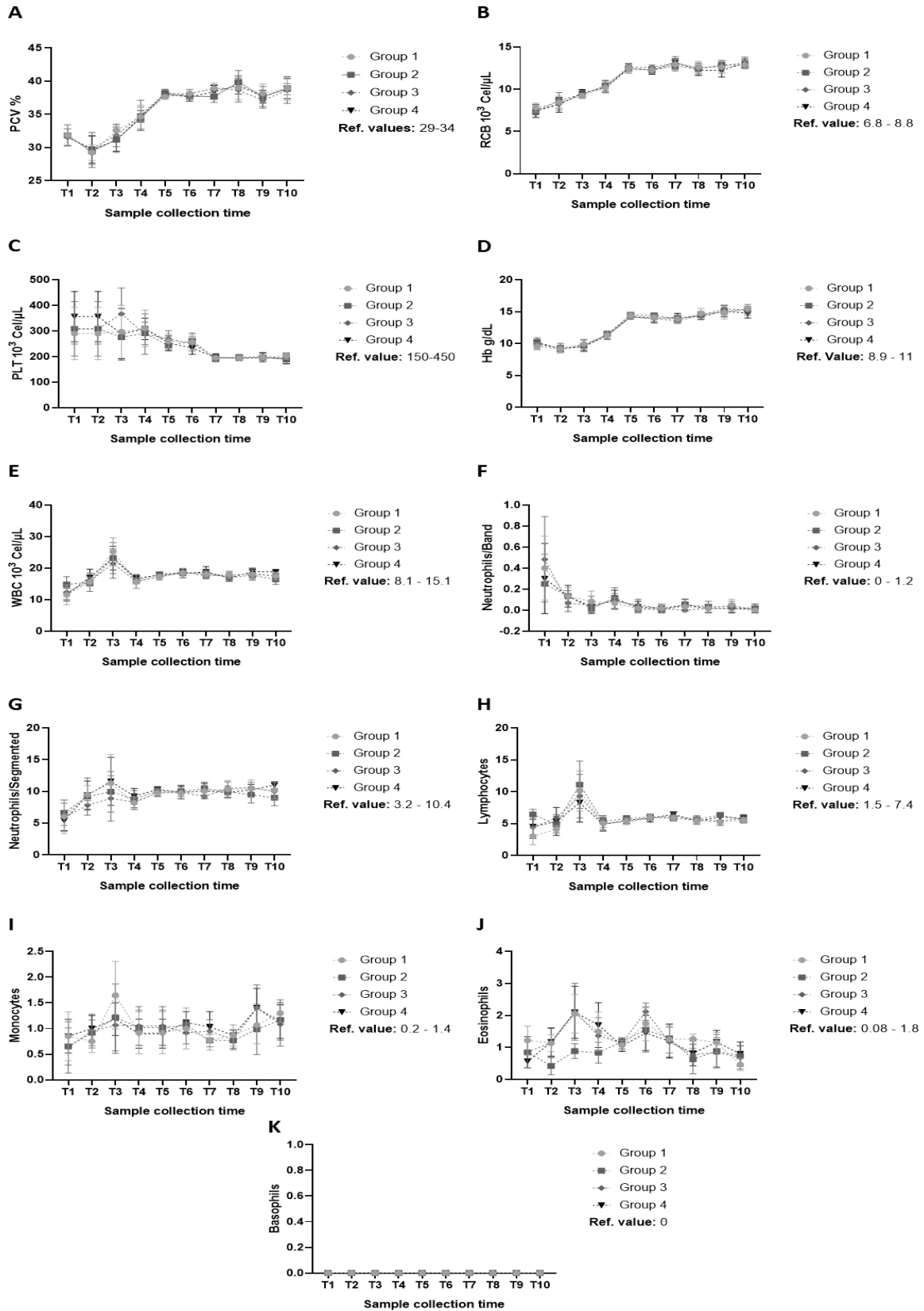


Figura 1. Análisis de marcadores hematológicos de los animales durante el

experimento. G1, grupo 1, grupo control; G2, grupo 2, grupo profilaxis; G3, grupo 3, grupo de inmunoterapia; G4, grupo 4, grupo de infección natural. T - tiempo.

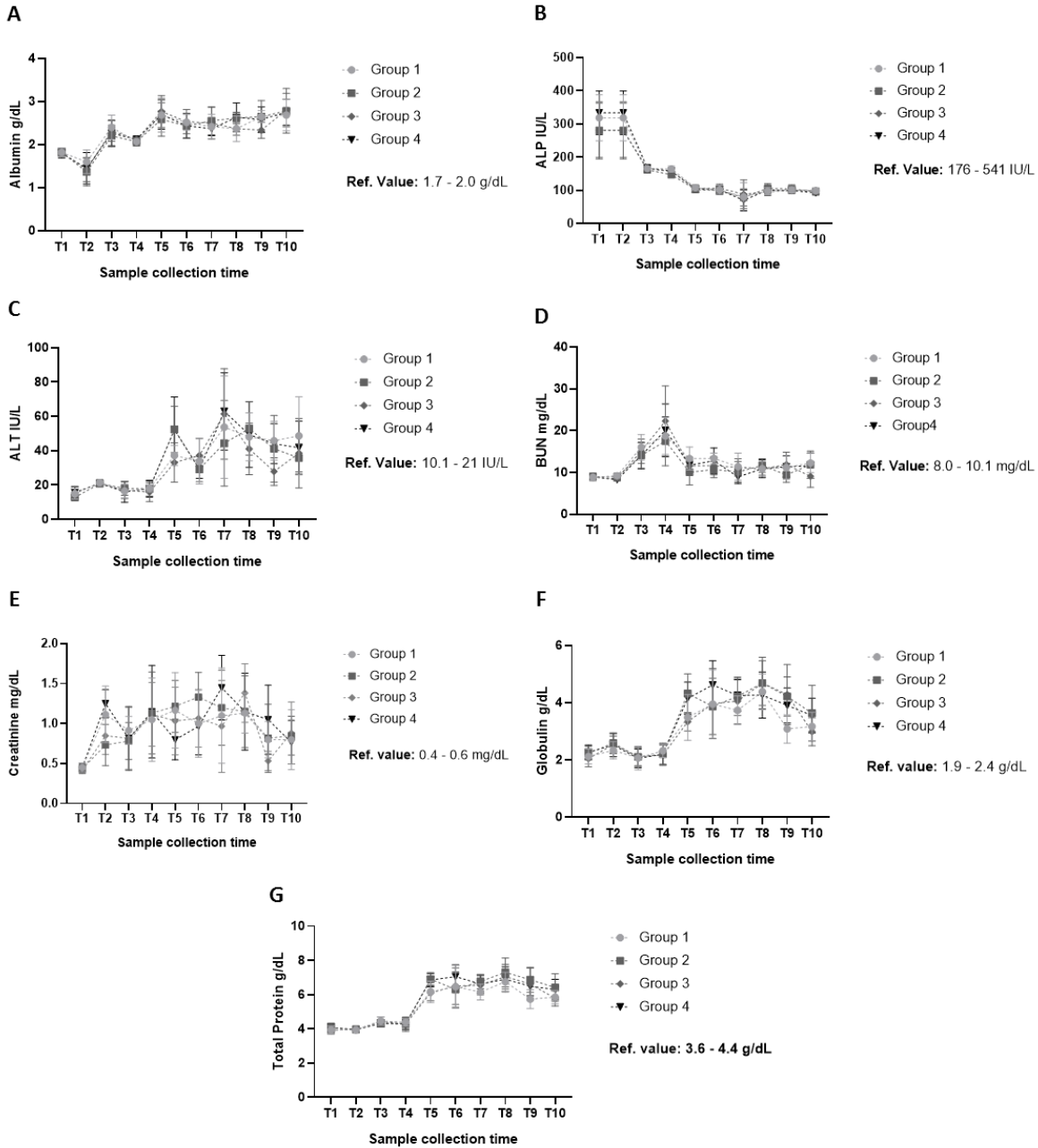


Figura 2. Análisis de marcadores de química sanguínea de los animales durante el experimento. G1, grupo 1, grupo control; G2, grupo 2, grupo profilaxis; G3, grupo 3, grupo de inmunoterapia; G4, grupo 4, grupo de infección natural. T -Tiempo.

En los últimos años, se ha expresado una gran cantidad de proteínas recombinantes en microorganismos (biofábricas) como *Escherichia coli* (Gomar y Kumar, 2013) y levaduras (Nielsen, 2013), con una alta productividad debido al rápido desarrollo de las tecnologías de ingeniería genética. El uso de estas proteínas como alternativa terapéutica o profiláctica tiene varias ventajas sobre los fármacos compuestos por moléculas pequeñas, ya que las proteínas recombinantes tienen funciones específicas que compuestos químicos simples no pueden imitar, adicionalmente su tiempo para el desarrollo clínico y aplicación en la industria farmacéutica puede ser más rápido que para los medicamentos de moléculas pequeñas (Nielsen, 2013).

Con respecto a los ensayos de expresión génica (Figuras 3 y 4), los resultados no fueron del todo concluyentes, como se muestra en la Figura 3, las PMBC tomadas el día 60 post-infección experimental, el gen constitutivo ACTB se expresó con éxito (línea roja), sin embargo, los genes referentes a citocinas (otras líneas de colores), las señales emitidas estaban por debajo del CT calculado por lo que no pueden ser considerados como resultados positivos. En el ciclo 46-50 (Figura 4) hubo expresión sin significancia estadística del gen IL-17A (línea azul cielo), IL-5 (línea amarilla) e IFN- γ (línea verde) en las PBMC estimuladas con fitohemaglutinina (control positivo), TES y rTcVcan, respectivamente; es decir la aplicación de la vacuna (rTcVcam + Quil A®) en caninos cachorros podría tener una tendencia de respuesta inmunológica mixta, que vincula 1 (IFN- γ), 2 (IL-5) y 3 (IL-17^a) tipos de respuesta del sistema inmune; resultado que deberá confirmarse en próximos experimentos, donde el papel inmunodireccionante del adyuvante Quil A® será la base de explicación plausible de este comportamiento del sistema inmune de los cachorros inmunizados.

Así mismo, este hallazgo inconcluso del ensayo de expresión génica se puede atribuir a dificultades logísticas que pudieron haber influido directamente en el material experimental, lo cual no permitió obtener resultados precisos. Sin embargo, hay evidencia de que la infección de *Toxocara* sp. es un factor preponderante en la modulación de la producción de diferentes citocinas, la evidencia muestra que los niveles de IL-10 aumentan significativamente en hembras caninas gestantes y en hembras caninas infectadas. Así mismo, en cachorros infectados las concentraciones de IL-10 se reducen conforme aumenta la edad de estos animales. Por otro lado, la producción de interferón (IFN) también se ve afectada en caninas gestantes con *T. canis*, ya que esta citocina disminuye, y en cachorros infectados aumenta con la edad (Torina et al., 2005). Estos hallazgos sugieren el poder inmunomodulador del parásito en huéspedes definitivos.

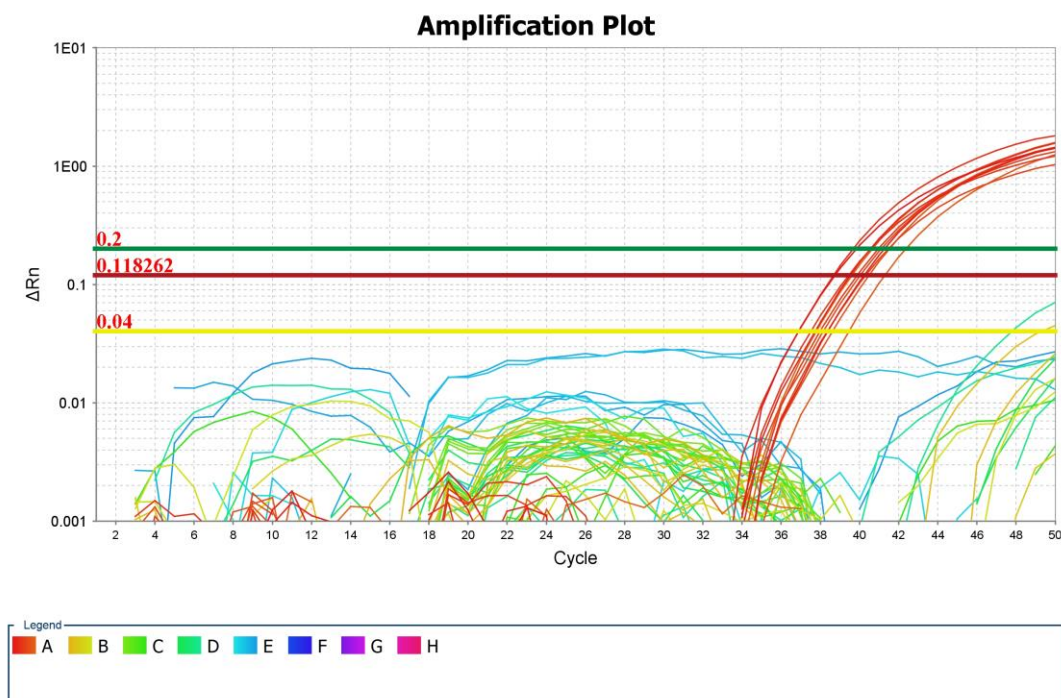


Figura 3. Producción de citoquinas en PBMC de caninos, cultivadas durante 24 horas con rTcVcan, TES y Fitohemaglutinina. Se muestran los resultados para el gen ACTB (A, línea roja), IL-5 (B, línea amarilla), INF- γ (C, línea verde), IL-10 (D,

verde fluorescente), IL-17A (E, línea azul cielo), TNF- α (F, línea azul rey), IL-6 (G, línea morada) y RPMI 1640 (H, línea fucsia).

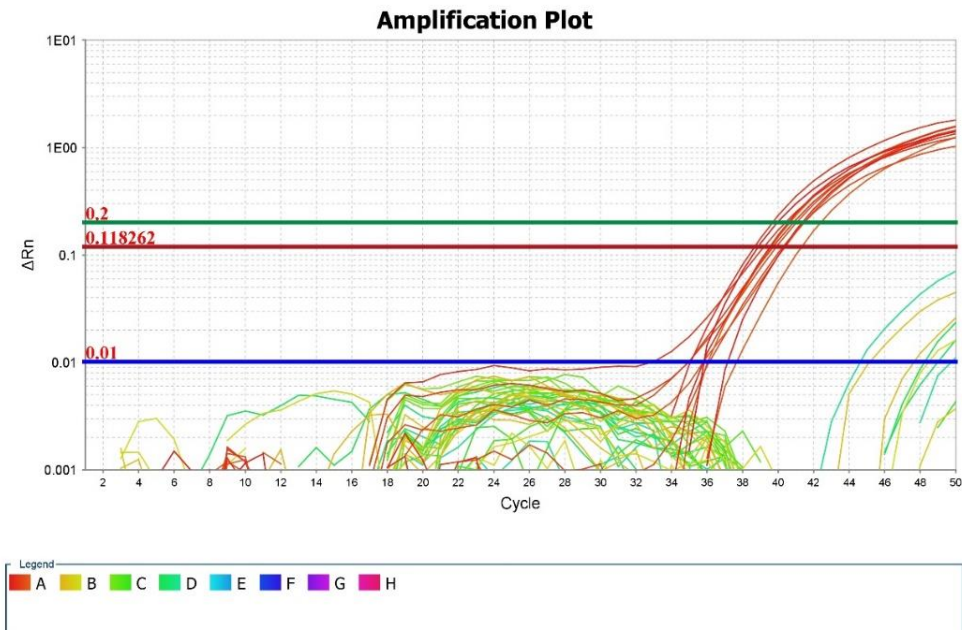


Figura 4. Producción de citoquinas en PBMC de caninos, cultivadas durante 48 horas con rTcVcan, TES y Fitohemaglutinina. Se muestran los resultados para el gen ACTB (A, línea roja), IL-5 (B, línea amarilla), INF- γ (C, línea verde), IL-10 (D, verde fluorescente), IL-17A (E, línea azul cielo), TNF- α (F, línea azul rey), IL-6 (G, línea morada) y RPMI 1640 (H, línea fucsia).

CONCLUSIONES

La fórmula vacunal experimental TcVcan 25 μ g + Quil-A[®] 100 μ g, la cual utiliza la proteína recombinante promisorio profiláctica contra *T. canis*, no fue tóxica, ni tuvo efectos adversos en los cachorros vacunados en el ensayo clínico.

La expresión génica de los genes ACTB, IL-5, IL-6, IL-17A, IL-10, TNF- α e INF- γ en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de los cachorros vacunados

con la proteína recombinante rTcVcan de *T. canis* no presentaron resultados concluyentes respecto al tipo de respuesta inmune que induce esta proteína en los cachorros que podría estar explicando el tipo de protección inducida para aminorar significativamente la infección por *T. canis* en caninos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bowman DD. Helminths. Georgis' Parasitology for Veterinarians E-Book. 2014. 10^{ma} ed. Saunders, St. Louis, pp: 122–240.
 2. Companion Animal Parasite Council (CAPC). Recommendations on Parasite Control Hookworms, 2016. Disponible en: <https://www.capcvet.org/capc-recommendations/hookworms>
 3. Chen J, Zhou DH, Nisbet AJ, Xu MJ, Huang SY, Li MW, et al. Advances in molecular identification, taxonomy, genetic variation and diagnosis of *Toxocara* spp. Infect Genet Evol. 2012; 12(7): 1344-1348. Doi: [10.1016/j.meegid.2012.04.019](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.04.019).
 4. Dantas-Torres F. *Toxocara* prevalence in dogs and cats in Brazil. Adv Parasitol. 2020;109:715-741. Doi: [10.1016/bs.apar.2020.01.028](https://doi.org/10.1016/bs.apar.2020.01.028).
 5. de Díaz F & Ancasí M. Enteroparásitos en perros (*Canis familiaris*) y gatos (*Felis catus*) de la provincia de Puno. Rev. Investig. Altoandín. 2013; 15(1): 117-122.
 6. Despommier D. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. Clin Microbiol Rev. 2003; 16(2): 265-72. Doi: [10.1128/CMR.16.2.265-272.2003](https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.265-272.2003).
 7. Dubucquoi S, Desreumaux P, Janin A, Klein O, Goldman M, Tavernier J, et al. Interleukin 5 synthesis by eosinophils: association with granules and immunoglobulin-dependent secretion. J Exp Med. 1994; 179(2):703-8. Doi: [10.1084/jem.179.2.703](https://doi.org/10.1084/jem.179.2.703).
 8. Elsemore DA, Geng J, Cote J, Hanna R, Lucio-Forster A, Bowman DD. Enzyme-linked immunosorbent assays for coproantigen detection of *Ancylostoma caninum* and *Toxocara canis* in dogs and *Toxocara cati* in cats. J Vet Diagn Invest. 2017; 29(5): 645-653. Doi: [10.1177/1040638717706098](https://doi.org/10.1177/1040638717706098).
 9. European Scientific Council for Parasitosis in Companion Animals ESCCAP. Worm Control in Dogs and Cats 1 (Sixth Edit, Issue February); 2020.
 10. Fillaux J, Magnaval JF. Laboratory diagnosis of human toxocariasis. Vet Parasitol. 2013; 193(4): 327-336. Doi: [10.1016/j.vetpar.2012.12.028](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.028).
 11. Gopal GJ, Kumar A. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. Protein J. 2013; 32(6):419 - 425. Doi: [10.1007/s10930-013-9502-5](https://doi.org/10.1007/s10930-013-9502-5).
-

12. Gorman T, Soto A, Alcaino H. Parasitismo gastrointestinal en perros de comunas de Santiago de diferente nivel socioeconómico. *Parasitol. latinoam.* [Internet]. 2006 Dic [citado 2023 Jul 29]; 61(3-4): 126-132. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-77122006000200005&lng=es.
 13. Huang L, Appleton JA. Eosinophils in Helminth Infection: Defenders and Dupes. *Trends Parasitol.* 2016; 32(10):798-807. Doi: [10.1016/j.pt.2016.05.004](https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.05.004).
 14. Jaramillo-Hernández DA, Salazar LF, Baquero M, Pinheiro CS, Alcantara-Neves NM. Toxocariasis and *Toxocara* vaccine: a review. *Revista Orinoquia*, 2020; 24: 79-95.
 15. Jaramillo-Hernández DA, Salazar Garcés LF, Pacheco LG, Pinheiro CS, Alcantara-Neves NM. Protective response mediated by immunization with recombinant proteins in a murine model of toxocariasis and canine infection by *Toxocara canis*. *Vaccine.* 2022; 40(6): 912-923. Doi: [10.1016/j.vaccine.2021.12.052](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.12.052).
 16. Llanos M, Condori M, Ibáñez T & Loza M. Parasitosis entérica en caninos (*Canis familiaris*) en el área urbana de Coroico, Nor Yungas Departamento de La Paz, Bolivia. *J. Selva Andina Res. Soc.* [Internet]. 2010 [citado 2023 Jul 29]; 1(1): 38-49. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2072-92942010000100005&lng=es.
 17. Ma G, Holland CV, Wang T, Hofmann A, Fan CK, Hotez PJ, et al. Human toxocariasis. *Lancet Infect Dis.* 2018; 18(1):e14-e24. Doi: [10.1016/S1473-3099\(17\)30331-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30331-6).
 18. Macpherson CN. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: a zoonosis of global importance. *Int. J. Parasitol.* 2013; 43: 999-1008. Doi: [10.1016/j.ijpara.2013.07.004](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.07.004).
 19. Maizels RM, Mcsorley HJ. Regulation of the host immune system by helminth parasites. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2016; 138:666-675. Doi: [10.1016/j.jaci.2016.07.007](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.07.007).
 20. Meeusen EN, Balic A. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? *Parasitol Today.* 2000; 16(3): 95-101. Doi: [10.1016/s0169-4758\(99\)01607-5](https://doi.org/10.1016/s0169-4758(99)01607-5).
 21. National Research Council (NRC) US Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.* 2011. 8th ed. Washington (DC): National Academies Press (USA).
 22. Nielsen J. Production of biopharmaceutical proteins by yeast: advances through metabolic engineering. *Bioengineered.* 2013; 4(4):207 - 211. Doi: [10.4161/bioe.22856](https://doi.org/10.4161/bioe.22856).
 23. Pinelli E, Aranzamendi C. *Toxocara* infection and its association with allergic manifestations. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2012; 12(1): 33-44. Doi: [10.2174/187153012799278956](https://doi.org/10.2174/187153012799278956).
-

24. Ramírez-Barrios RA, Barboza-Mena G, Muñoz J, Angulo-Cubillán F, Hernández E, González F, et al. Prevalence of intestinal parasites in dogs under veterinary care in Maracaibo, Venezuela. *Vet Parasitol.* 2004; 121(1-2):11-20. Doi: [10.1016/j.vetpar.2004.02.024](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.02.024).
 25. Regis SC, Mendonça LR, Silva S, Dattoli VC, Alcântara-Neves NM, Barrouin-Melo SM. Seroprevalence and risk factors for canine toxocariasis by detection of specific IgG as a marker of infection in dogs from Salvador, Brazil. *Acta Trop.* 2011; 120(1-2): 46-51. Doi: [10.1016/j.actatropica.2011.05.011](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.05.011).
 26. Resende NM, Gazzinelli-Guimarães PH, Barbosa FS, Oliveira LM, Nogueira DS, Gazzinelli-Guimarães AC, et al. New insights into the immunopathology of early *Toxocara canis* infection in mice. *Parasit Vectors.* 2015; 8:354. Doi: [10.1186/s13071-015-0962-7](https://doi.org/10.1186/s13071-015-0962-7).
 27. Rostami A, Ma G, Wang T, Koehler AV, Hofmann A, Chang BCH, et al. Human toxocariasis - A look at a neglected disease through an epidemiological 'prism'. *Infect Genet Evol.* 2019; 74:104002. Doi: [10.1016/j.meegid.2019.104002](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104002).
 28. Rubinsky-Elephant G. Human toxocariasis: Humoral response (IgG, IgA and IgE) anti-*Toxocara canis* and clinical-laboratorial correlation in patients following chemotherapy. *Rev Ins Med Trop São Paulo.* 2004; 46: 76-81.
 29. Ruiz-Manzano RA, Hernández-Cervantes R, Del Río-Araiza VH, Palacios-Arreola MI, Nava-Castro KE, Morales-Montor J. Immune response to chronic *Toxocara canis* infection in a mice model. *Parasite Immunol.* 2019; 41(12):e12672. Doi: [10.1111/pim.12672](https://doi.org/10.1111/pim.12672).
 30. Salazar LF, Santiago LF, Santos SPO, Jaramillo-Hernández DA, da Silva MB, Alves VDS, et al. Immunogenicity and protection induced by recombinant *Toxocara canis* proteins in a murine model of toxocariasis. *Vaccine.* 2020; 38(30): 4762-4772. Doi: [10.1016/j.vaccine.2020.04.072](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.04.072).
 31. Sarmiento-Rubiano LA, Delgado L, Ruiz JP, Sarmiento MC, Becerra J. Parásitos intestinales en perros y gatos con dueño de la ciudad de Barranquilla, Colombia. *Rev. investig. vet. Perú [Internet].* 2018 Oct [citado 2023 Jul 29]; 29(4): 1403-1410]. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172018000400036&lng=es.
 32. Schwartz R, Bidaisee S, Fields PJ, Macpherson MLA, Macpherson CNL. The epidemiology and control of *Toxocara canis* in puppies. *Parasite Epidemiol Control.* 2022; 16:e00232. Doi: [10.1016/j.parepi.2021.e00232](https://doi.org/10.1016/j.parepi.2021.e00232).
 33. Sugane K, Kusama Y, Takamoto M, Tominaga A, Takatsu K. Eosinophilia, IL-5 level and recovery of larvae in IL-5 transgenic mice infected with *Toxocara canis*. *J. Helminthol.* 1996; 70(2):153-158. Doi: [10.1017/s0022149x00015315](https://doi.org/10.1017/s0022149x00015315).
 34. Takamoto M, Wang ZX, Watanabe N, Matsuzawa A, Nariuchi H, Sugane K. Eosinophilia, IgE production, and cytokine production by lung T cells in surface CD4-deficient mutant mice infected with *Toxocara canis*. *Immunology.* 1998; 95(1):97-104. Doi: [10.1046/j.1365-2567.1998.00575.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1998.00575.x).
-

35. Torina A, Caracappa S, Barera A, Dieli F, Sireci G, Genchi C, et al. *Toxocara canis* infection induces antigen-specific IL-10 and IFN γ production in pregnant dogs and their puppies. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005; 108 (1-2): 247-251. Doi: [10.1016/j.vetimm.2005.08.006](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.08.006).
 36. Traversa D, Joachim A. The 3Rs Concept: Time to Change How We Evaluate the Efficacy of Anthelmintics in Companion Animals. *Trends Parasitol.* 2018; 34(1): 41-52. Doi: [10.1016/j.pt.2017.09.002](https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.09.002).
 37. Valli JL, Williamson A, Sharif S, Rice J, Shewen PE. In vitro cytokine responses of peripheral blood mononuclear cells from healthy dogs to distemper virus, *Malassezia* and *Toxocara*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010; 134(3-4):218-29. Doi: [10.1016/j.vetimm.2009.09.023](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.09.023).
 38. Zibaei M, Shayesteh Z, Moradi N, Bahadory S. Human *Toxocara* Infection: Allergy and Immune Responses. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.* 2019; 18(2):82-90. Doi: [10.2174/1871523018666181210115840](https://doi.org/10.2174/1871523018666181210115840).
-