



IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES RECEPTORES DE PROGESTERONA Y PROLACTINA EN LARVAS DE *Toxocara canis*

Chávez-Güitrón L.^a, Nava-Castro K.^b Muñoz-Guzmán M.^c, Morales-Montor J.² y Alba-Hurtado, F.^c

^aDivisión de Biotecnología, Universidad Tecnológica de Tecámac, Edo. de México. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal de la UNAM.

^bDepartamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. ^cDepartamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. fealba@hotmail.com.

RESUMEN

En perros adultos las larvas de *T. canis* se enquistan en diferentes tejidos, durante la gestación, las larvas se reactivan y se transmiten por vía transplacentaria y lactogénica a los cachorros. En esta etapa gestacional, se ha propuesto que las variaciones hormonales observadas en este periodo están relacionadas con la reactivación. Lo que implicaría que las larvas son capaces de reconocer estas variaciones hormonales y utilizarlas para su desarrollo. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue determinar la presencia de posibles receptores de progesterona y prolactina en larvas de *T. canis*. Las células de larvas de *T. canis* fueron disgregadas y analizadas por citometría de flujo. La presencia de posibles receptores se evaluó en larvas de *T. canis* mantenidas en cultivos durante 20, 35 y 57 días. Los anticuerpos utilizados reconocieron células de larvas de *T. canis*, por lo que probablemente tengan receptores para las hormonas evaluadas. En general, el porcentaje de células positivas obtenidas de larvas de *T. canis* aumentó conforme se incrementó la duración de los cultivos. Los resultados sugieren que las larvas de *T. canis* presentan receptores que reconocen algunas hormonas de la gestación y éstas podrían ser las responsables de la reactivación de las larvas.

Financiado por proyecto PAPIIT IN215314

1.0 INTRODUCCIÓN

Toxocara canis es uno de los nematodos más frecuentes en perros a nivel mundial. Las fases adultas afectan principalmente a los cachorros, produciéndoles problemas digestivos, afectando su desarrollo y ocasionando muertes esporádicas en infestaciones severas. En perros adultos y hospederos paraténicos, las larvas se encuentran en estado de latencia en diferentes órganos, como: hígado, riñones, pulmones, músculos, ojos y cerebro (Schnieder, *et al.*, 2011). Las larvas latentes presentes en los tejidos de las perras se reactivan durante el último tercio de la gestación y migran desde los tejidos hasta el útero y la glándula mamaria, infectando a sus cachorros. Tomando en cuenta que las larvas que se encuentran en latencia en los tejidos, se reactivan únicamente durante la segunda mitad de la gestación, es probable que algún evento fisiológico en la perra, asociado a este estado, es el detonante de la reactivación.

Fisiológicamente, uno de los eventos más importantes en esta etapa son las variaciones hormonales, principalmente de estrógenos, prolactina y progesterona.

Las hormonas esteroidales 17- β estradiol (E2) y progesterona (P4), así como la hormona proteica, prolactina, actúan activando células del tracto reproductivo de la perra a través de la unión a receptores celulares específicos (Concannon, 2011; Pfaff *et al.* 1994). En este contexto, es probable que si las larvas de *T. canis* pueden utilizar estas hormonas en su reactivación, deben contar con receptores específicos para las mismas. Por lo anterior, el objetivo del presente proyecto, fue determinar por citometría de flujo la presencia de posibles receptores para progesterona, estrógenos y prolactina en larvas de *T. canis*.



2.0 PARTE EXPERIMENTAL

Obtención y cultivo de larvas.-Se recolectaron parásitos adultos de *Toxocara canis* a partir de necropsias realizadas a cachorros de entre uno y tres meses de edad, que fueron donados por los centros antirrábicos de Cuautitlán y Ecatepec en el Edo.de México. Los huevos se obtuvieron y cultivaron de acuerdo a la técnica de Oshima (1961). La obtención de las larvas se realizó siguiendo el método desarrollado por De Savigny (1975) y modificado por Bowman *et al.*, (1987). Las larvas obtenidas se cultivaron en medio de cultivo estéril RPMI-1640, buferado con HEPES a un pH de 7.2, adicionado con 100 U/μg/ml de Penicilina y Estreptomicina, 2.5 μg/ml de Anfotericina B y glucosa al 1% (Maizels, *et. al.*, 1984). El cultivo se mantuvo a una concentración de 1,000 larvas/ml y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de humedad. Semanalmente se cambió el medio de cultivo.

Detección de receptores de Progesterona (PR), Estrógenos α (ERα), Estrógenos β (ER β) y Prolactina (PRL-R) por Citometría de Flujo.-

Las células de larvas 2 de *T. canis* fueron disgregadas y analizadas de acuerdo a la técnica descrita por Nava-Castro *et. al.* 2011. La tinción intracelular de las células se realizó con los siguientes anticuerpos: anti-PR, anti-PRL-R. Como anticuerpos secundarios se utilizaron un anti-IgG de ratón (eBioscience, USA) y anti-IgG de conejo (Molecular, Probes ®, USA) acoplados con APC y Alexa 647 respectivamente. Se utilizaron células de útero de ratón como control positivo para todos los anticuerpos. La presencia de receptores para: PR, PRL-R se evaluó en larvas 2 de *T. canis* de 20, 35 y 57 días de cultivo larvario. Todas las muestras fueron analizadas utilizando un equipo FACS Calibur (BD, Biosciences, USA), se identificaron las poblaciones celulares predominantes agrupadas por tamaño, granularidad y fluorescencia, midiendo diez mil eventos por muestra y los datos fueron analizados con el software FlowJo ®.

En la figura 1 se compara el tamaño y granularidad de células disgregadas de bazo de ratón (1a), larvas de *Trichinella spiralis* (1b) y larvas de *T. canis* (1c). Las células de bazo de ratón fueron hasta 3 veces más grandes y complejas que las células de larvas de *T. canis* y *T. spiralis*, no se observaron diferencias entre células de *T. canis* y de *T. spiralis*.

Los anticuerpos anti-PR y anti-PRL-R reconocieron células de *T. canis* (figura 2). El porcentaje de células reconocidas por ambos anticuerpos varió de acuerdo al tiempo de cultivo de las larvas.

El porcentaje de células-PR+ obtenidas de larvas cultivadas a los 20, 35 y 57 días fue de 6.5, 13.6 y 17.1 respectivamente. El porcentaje de células-PRL-R+ obtenidas de larvas cultivadas a los 20, 35 y 57 días fue de 10.3, 10.3 y 13.9 respectivamente. La expresión de receptores anti-PR presentó variaciones porcentuales en los diferentes días de cultivo larvario (Fig. 2).

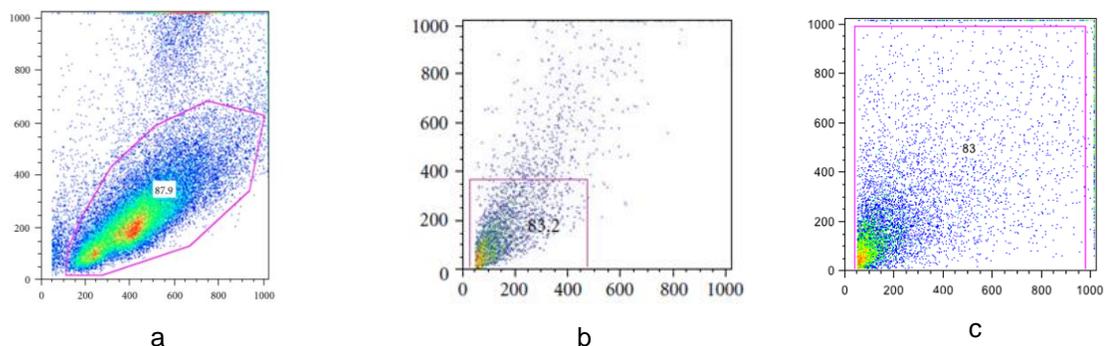


Fig. 1. Comparación entre tamaño y granularidad de células de bazo de ratón (a) de *T. spiralis* (b) y de *T. canis* (c)

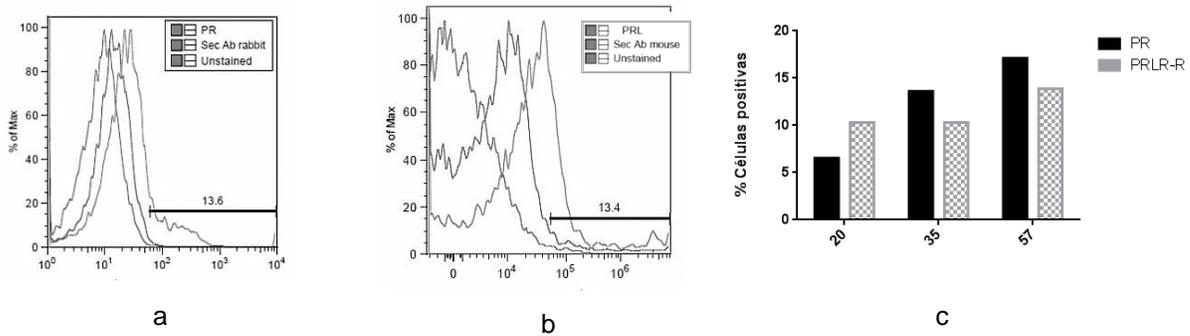


Fig. 2. Porcentaje de células positivas a PR (a) y PRL-R (b) a los 35 días de cultivo larvario y en diferentes días de cultivo larvario (c)

La granularidad de células se ha usado en forma indirecta para medir complejidad celular. En estudios previos se ha demostrado que las células disgregadas de larvas de *T. spiralis* son aproximadamente 3 veces de menor tamaño y complejidad que las células de bazo de ratón (Nava-Castro *et. al.* 2011). En el presente estudio se demostró que las células de *T. canis* son similares en tamaño y granularidad a las de *T. spiralis* y menores a las de bazo. Lo anterior, nos permitió estandarizar la técnica para su estudio.

Se ha demostrado que las células blanco de diferentes hormonas, presentan receptores hormonales específicos y que éstos pueden ser detectados por anticuerpos monoclonales. En el presente estudio se demostró que estos anticuerpos monoclonales para receptores de estrógenos, progesterona y prolactina reconocen algunas células de larvas de *T. canis*, por lo que probablemente estas células presentan dichos receptores.

En los receptores hormonales específicos se fijan las hormonas a sus células blanco dentro del hospedero y las activan. Si las células de larvas de *T. canis* tienen receptores que reconocen estrógenos, progesterona y prolactina, es probable que estas hormonas se fijan a estas células y también las activen. Esto podría explicar la reactivación de las larvas durante la gestación, que es el estado fisiológico en el que aumentan estas hormonas en el hospedador.

La expresión de diversos genes de las larvas de *T. canis*, probablemente esté asociado a la maduración de las larvas. En el presente estudio, se observó que a mayor tiempo de cultivo *in vitro* de las larvas, aumentó el porcentaje de células con los probables receptores hormonales, lo que probablemente este asociado a la maduración de las larvas.

Sin embargo, se requieren estudios como aislamiento y secuenciación de los receptores e identificación de genes que codifiquen para los receptores hormonales en las células de *T. canis* para confirmar esta hipótesis



BIBLIOGRAFIA

1. Bowman Dd, Mika-Grieve M, Grieve Rb. 1987. Circulating excretory-secretory antigen levels and specific antibody responses in mice infected with *Toxocara canis*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 36: 75-82.
2. Concannon *et. al.*, 2011. Reproductive cycles of the domestic bitch. An. Reprod. Sci. 124: 200-210.
3. De Savigny, D.H. 1975. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnosis test for visceral larva migrans. J. Parasitol. 61: 781-782.
4. Maizels R. De Savigny D, Ogilvie Bm. 1984. Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. Parasite Immunol. 6: 23-37.
5. Nava-Castro, *et. al.*, 2011. New Method to disaggregate and analyze single isolated helminthes cells using flow cytometry: proof of concept. J. Biomed. Biotech. Article ID 257060: 1-9
6. Oshima T. 1961. Standardization of techniques for infecting mice with *Toxocara canis* and observations on the normal migration routes of the larvae. J. Parasitol. 47: 652-656.
7. Schnieder, *et. al.*, 2011. Larval development of *Toxocara canis* in dogs. Vet. Parasitol. 175: 193-206.
8. Pfaff, *et. al.*, 1994. Competition for DNA steroid response elements as a possible mechanism for neuroendocrine integration. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 49: 373-379.