



Universidad Autónoma de Sinaloa

Facultad de Ciencias Químico Biológicas

Doctorado en Ciencias Biomédicas



Estudio inmunohistopatológico de la interacción hospedero-parásito durante una de *Didelphis virginiana* con *Gnathostoma turgidum*: modelo animal para el estudio de la gnathostomosis

TESIS

Que presenta

M. en C. José Marcial Zazueta Moreno

Como requisito para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Directores

Dr. Lorenzo Ulises Osuna Martínez

Dr. Edith Hilario Torres Montoya

Culiacán, Sinaloa, Diciembre de 2019.

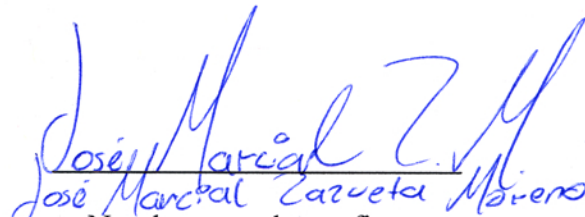


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán de Rosales el día 5 del mes Diciembre del año 2019, el (la) que suscribe José Marcial Zazueta Moreno alumno (a) del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas con número de cuenta 0715703-7, de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Lorenzo Ulises Osuna Martínez y Dr. Edith Hilario Torres Montoya y cede los derechos del trabajo titulado “Estudio inmunohistopatológico de la interacción hospedero-parásito durante una infección de *Didelphis virginiana* con *Gnathostoma turgidum*: modelo animal para el estudio de la gnathostomosis”, a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.


Nombre completo y firma

DEDICATORIAS

A mi madre y abuela Eloísa Romero Delgado (mamá Locha) a donde sea la parte del Universo que sea que se encuentre, fue, es y seguirá viviendo siempre en mí, un beso hasta su mejilla de abuela de parte del chiquicuyo.

Dedico también esta tesis a mis sobrinos, pues en ellos veo la inquietud y curiosidad que cualquier niño tiene y debe ser alimentada, como dijo en algún momento Antoine de Saint-Exupéry, corrijo mi dedicatoria: a mis sobrinos Xavier Fernando Zazueta Molinero, Ian Emiliano Zazueta molinero, Crixus Emanuel Blancarte Pérez y a mi yo de niño, que seguro estoy estaría contento de saber que el ahora adulto está cumpliendo los sueños de “científico” que alguna vez tuvo.

Dedico con todo mi amor este trabajo, a mi niña, Yilian Zulema Blancarte Pérez, te envío un beso enorme a donde te encuentres, se te extraña, esta tesis va por ti...

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Químico Biológicas y al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas por abrirme sus puertas y recibirme como estudiante.

A la Facultad de Biología por permitirme el uso de sus instalaciones para la realización de este proyecto.

A CONACyT por la beca otorgada.

A los doctores José Guadalupe Rendón Maldonado y Lorenzo Ulises Osuna Martínez por el apoyo y confianza brindados durante el periodo de mi formación como doctor.

A la comunidad de Tecualilla, Escuinapa, Sinaloa, en especial a Pedro Rendón y su familia, sin ellos, su acompañamiento y su bien recibimos durante nuestras pernoctadas y trabajo durante las jornadas en campo, este trabajo no hubiera sido posible. Quiero incluir en este agradecimiento a los niños Pedrito, Miguel, la Chita, Jairo y el Chacuana, (los niños sicarios) que son nuestra guía, ayudantes y guardaespaldas en el pueblo, de ellos obtenemos la verdadera enseñanza de esta labor.

A mis compañeros de laboratorio Fabiola Patricia Pérez Sánchez, Leonardo Ulloa Urquidi, José Israel Torres Avendaño, Juan José Ríos Tostado, Rosa Isela Tabares e Iliana Cota Gerardo, por el apoyo, discusión de ideas, pláticas interminables, comidas compartidas y tantos momentos vividos dentro y fuera de las instalaciones del laboratorio.

Al Dr. Hipólito Castillo Ureta por depositar su confianza y amistad en mí, por abrirme las puertas de su laboratorio y por apoyarme al respaldar por completo este proyecto.

Al Dr. Edith Hilario Torres Montoya por la confianza, el apoyo y respaldo incondicional depositado en mí. Por el aporte intelectual y la discusión de ideas que sin duda alguna fueron

nutritivos y muy importantes para este trabajo. Más valioso aún, debo agradecer por la amistad que empezó, desarrolló, fortaleció y consolidó durante los últimos 7 años.

A mi familia, en especial a mi hermano José Fernando Zazueta Moreno por el apoyo incondicional, a mi tía María del Rosario Moreno Romero cuasi madre, por recibirme desde hace más de 10 años en Culiacán y ser un empujón de ánimo y apoyo durante mi formación profesional. Agradezco a mis sobrinos, Xavier, Crixus y Emiliano, por ser ese respiro de alegrías nuevas y curiosidades interminables cada vez que nos encontramos, los amo.

De mi Familia, agradezco totalmente a mi madre Yolanda Primitiva Moreno Romero, por creer siempre en mí, con mis virtudes y defectos, por su amor incondicional, por impulsarme siempre adelante y por compartir mis sueños, te amo...

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE CUADROS	X
I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT.....	2
III. INTRODUCCIÓN	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	6
4.1. Interacciones biológicas y parasitismo.....	6
4.2. Gnathostomosis humana	7
4.3. Respuesta inmunológica	9
4.4. Casos clínicos de gnathostomosis humana.....	11
4.5. Taxonomía y etiología de <i>Gnathostoma</i>	13
4.6. Distribución de <i>Gnathostoma</i> en México	14
4.7. Morfología del género <i>Gnathostoma</i>	17
4.7.1. Adulto	17
4.7.2. Larva del tercer estadio avanzado (L3A).....	17
4.7.3. Morfología del huevo	18
4.8. Ciclo de vida de <i>Gnathostoma</i>	21
4.9. Antecedentes.....	24
4.9.1. Estudios en Sinaloa sobre la biología y ciclo de vida de <i>Gnathostoma</i>	24
4.9.2. Infecciones experimentales de hospederos intermediarios y modelos animales con <i>Gnathostoma</i>	28
4.9.2.1. Infecciones experimentales en posibles hospederos intermediarios de <i>Gnathostoma</i>	28
4.9.2.2. Infecciones experimentales con <i>Gnathostoma</i> en modelos animales	29
V. JUSTIFICACIÓN.....	31
VI. HIPÓTESIS.....	32
VII. OBJETIVOS	33
7.1. Objetivo general.....	33
7.2. Objetivos específicos	33
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	34

8.1. Tipo de estudio	34
8.2. Diseño experimental	34
8.3. Etapa experimental 1	38
8.3.1. <i>Captura y cultivo de copépodos</i>	38
8.3.2. <i>Identificación morfológica de copépodos</i>	38
8.3.3. <i>Captura de anuros del género Rana</i>	39
8.3.4. <i>Desarrollo in vitro de L2 de G. turgidum</i>	39
8.3.5. <i>Infección experimental de M. edax con larvas L2 de G. turgidum: evaluación de la capacidad de ingesta de copépodos sobre L2 y su asociación con la carga parasitaria</i>	39
8.3.6. <i>Infección experimental de anuros del género Rana con L3T de G. turgidum</i>	40
8.4. Etapa experimental 2	41
8.4.1. <i>Captura de Didelphis virginiana y mantenimiento en condiciones de cautiverio</i>	41
8.4.2. <i>Inmunosupresión de D. virginiana</i>	42
8.4.3. <i>Evaluación del número total y conteo diferencial de leucocitos en sangre de D. virginiana infectados con G. turgidum</i>	42
8.4.3.1. <i>Conteo total de células leucocitarias en frotis sangre periférica de D. virginiana infectados con G. turgidum</i>	42
8.4.3.2. <i>Conteo diferencial de leucocitos en sangre periférica de D. virginiana infectados con G. turgidum</i>	43
8.4.3.3. <i>Análisis estadístico</i>	43
8.5. Etapa experimental 2	43
8.5.1. <i>Evaluación del daño histopatológico de hígado y estómago causado por G. turgidum en D. virginiana</i>	43
8.5.1.1. <i>Procesamiento histológico de hígado y estómago de D. virginiana</i>	44
8.5.1.2. <i>Tinción con hematoxilina y eosina</i>	45
8.5.1.3. <i>Tinción tricrómica de Masson</i>	45
IX. RESULTADOS	47
9.1. Identificación morfológica de M. edax	47
9.2. Desarrollo in vitro de L2 de G. turgidum	47
9.4. Capacidad de ingesta de M. edax sobre larvas de G. turgidum	50
9.5. Infección experimental de anuros del género Rana L3T de G. turgidum	50
9.7. Evaluación del daño histopatológico y cambio del volumen de las estirpes leucocitarias de D. virginiana infectados con G. turgidum	53
9.7.1. <i>Conteo total de leucocitos en sangre periférica de D. virginiana con y sin tratamiento inmunosupresor infectados con G. turgidum</i>	53

9.7.2. Conteo diferencial de neutrófilos en sangre periférica de <i>D. virginiana</i> con y sin tratamiento inmunosupresor e infectados con <i>G. turgidum</i>	56
9.7.3. Conteo diferencial de linfocitos en sangre periférica de <i>D. virginiana</i> con y sin tratamiento inmunosupresor e infectados con <i>G. turgidum</i>	57
9.7.4. Conteo diferencial de monocitos en sangre periférica de <i>D. virginiana</i> con y sin tratamiento inmunosupresor e infectados con <i>G. turgidum</i>	60
9.7.5. Conteo diferencial de basófilos en sangre periférica de <i>D. virginiana</i> con y sin tratamiento inmunosupresor e infectados con <i>G. turgidum</i>	60
9.7.5. Conteo diferencial de basófilos en sangre periférica de <i>D. virginiana</i> con y sin tratamiento inmunosupresor e infectados con <i>G. turgidum</i>	61
9.7.6. Conteo diferencial de eosinófilos en sangre periférica de <i>D. virginiana</i> con y sin tratamiento inmunosupresor e infectados con <i>G. turgidum</i>	61
9.8. Evaluación del daño histopatológico de hígado y estómago causado por <i>G. turgidum</i> en <i>D. virginiana</i>	65
9.8.1. Evaluación histopatológica de hígado	65
9.8.2. Evaluación histopatológica de estómago.....	66
X. DISCUSIÓN	71
10.1. Primeros estudios de <i>Gnathostoma</i> en Sinaloa	71
10.2. Evaluación de <i>M. edax</i> como hospedero intermediario de larvas de <i>G. turgidum</i>	72
10.3. Evaluación de anuros del género <i>Rana</i> como posibles hospederos intermediarios de <i>G. turgidum</i>	75
10.4. Tipificación de los niveles de células leucocitarias de <i>D. virginiana</i> inmunosuprimidos y no inmunosuprimidos infectados con <i>G. turgidum</i> y estudiar su relación con la cura espontánea.	77
10.5. Conteo diferencial de neutrófilos en sangre periférica de <i>D. virginiana</i> con y sin tratamiento inmunosupresor e infectados con <i>G. turgidum</i>	80
10.6. Conteo diferencial de linfocitos en sangre periférica de <i>D. virginiana</i> con y sin tratamiento inmunosupresor e infectados con <i>G. turgidu</i>	81
10.7. Conteo diferencial de monocitos en sangre periférica de <i>D. virginiana</i> con y sin tratamiento inmunosupresor e infectados con <i>G. turgidum</i>	83
10.8. Conteo diferencial de basófilos en sangre periférica de <i>D. virginiana</i> con y sin tratamiento inmunosupresor e infectados con <i>G. turgidum</i>	84
10.9. Conteo diferencial de eosinófilos en sangre periférica de <i>D. virginiana</i> con y sin tratamiento inmunosupresor e infectados con <i>G. turgidum</i>	85
10.10. Evaluación del daño histopatológico causado por <i>G. turgidum</i> en <i>D. virginiana</i>	87
XI. CONCLUSIONES	92
11.1. Conclusión general	92
11.1.1. Conclusiones específicas.....	92

XII.	LIMITACIONES DEL PROYECTO	93
XIII.	BIBLIOGRAFÍA.	94
XIV.	ANEXOS.....	109
	11.1. Perspectivas	109
	11.2. Productos	110
XV.	SIGLAS Y ABREVIACIONES	113

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de <i>G. binucleatum</i> y <i>G. turgidum</i> en México..	15
Figura 2. Distribución de <i>Gnathostoma lamothei</i> y <i>Gnathostoma</i> spp.	16
Figura 3. Fotomicrografía electrónica de barrido del gusano adulto de <i>G. binucleatum</i> .	19
Figura 4. Larva de tercer estadio avanzada de <i>Gnathostoma</i> sp.	20
Figura 5. Huevos de <i>Gnathostoma</i> sp.	21
Figura 6. Ciclo de vida <i>Gnathostoma</i> .	23
Figura 7. Etapa experimental 1.	35
Figura 8. Etapa experimental 2.	37
Figura 9. Identificación morfológica de <i>M. edax</i> .	48
Figura 10. Desarrollo in vitro de larvas L2 de <i>G. turgidum</i> .	49
Figura 11. Capacidad de ingesta de <i>M. edax</i> expuesto a diferentes densidades de larvas L2 de <i>G. turgidum</i> .	51
Figura 12. Tejido muscular de anuro del género <i>Rana</i> .	52
Figura 13. Conteo total de leucocitos en sangre periférica de <i>D. virginiana</i> sometidos a tratamiento de inmunosupresión e infectados con <i>G. turgidum</i> .	55
Figura 14. Conteo diferencial de neutrófilos en sangre periférica de <i>D. virginiana</i> sometidos a tratamiento de inmunosupresión e infectados con <i>G. turgidum</i> .	58
Figura 15. Conteo diferencial de linfocitos en sangre periférica de <i>D. virginiana</i> sometidos a tratamiento de inmunosupresión e infectados con <i>G. turgidum</i> .	59
Figura 16. Conteo diferencial de monocitos en sangre periférica de <i>D. virginiana</i> sometidos a tratamiento de inmunosupresión e infectados con <i>G. turgidum</i> .	62
Figura 17. Conteo diferencial de basófilos en sangre periférica de <i>D. virginiana</i> sometidos a tratamiento de inmunosupresión e infectados con <i>G. turgidum</i> .	63
Figura 18. Conteo diferencial de eosinófilos en sangre periférica de <i>D. virginiana</i> sometidos a tratamiento de inmunosupresión e infectados con <i>G. turgidum</i> .	64
Figura 19. Cortes histológicos de hígado de <i>D. virginiana</i> de los grupos control inmunosuprimidos, infectados e infectados inmunosuprimidos, tinción hematoxilina y eosina.	67
Figura 20. Cortes histológicos de hígado de <i>D. virginiana</i> de los grupos control inmunosuprimidos, infectados e infectados inmunosuprimidos, tinción tricrómica de Masson.	68
Figura 21. Cortes histológicos de estómago de <i>D. virginiana</i> de los grupos control inmunosuprimidos, infectados e infectados inmunosuprimidos tinción hematoxilina y eosina.	69
Figura 22. Cortes histológicos de estómago de <i>D. virginiana</i> de los grupos control inmunosuprimidos, infectados e infectados inmunosuprimidos tinción tricrómica de Masson.	70

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Hospederos intermediarios, paraténicos y definitivos de <i>Gnathostoma</i>, identificados en Sinaloa.....	26
Cuadro 2. Resumen del conteo diferencial y total de células leucocitarias en sangre periférica de <i>D. virginiana</i> infectados con <i>G. turgidum</i> y controles.	54

I. RESUMEN

Sinaloa es un área endémica para dos especies de *Gnathostoma*, donde el tlacuache *Didelphis virginiana* es el hospedero definitivo de *G. turgidum* y algunas especies de peces dulceacuícolas se han identificado como hospederos intermediarios de *G. binucleatum*, actualmente reconocido como agente causal de la enfermedad en humanos. Aún se desconoce el ciclo de vida completo de ambas especies, lo que dificulta el entendimiento del comportamiento del parásito durante la infección, también la posibilidad de implementar estrategias de prevención y tratamiento de la enfermedad. En el presente trabajo, se estudió la interacción hospedero-parásito empleando como modelo animal a *D. virginiana* infectados con *G. turgidum*. Se evaluó a copépodos *Mesocyclops edax* como hospederos intermediarios de *G. turgidum* y fue evaluada la capacidad depredativa de copépodos expuestos a diferentes densidades de larvas del segundo estadio. Como segundos hospederos intermediarios fueron evaluados anuros de la especie *Rana pipens* durante la interacción *in vitro* con larvas del tercer estadio de *G. turgidum*. Además, se evaluó el daño histológico y la variación de la respuesta de células inmunológicas en tlacuaches inmunosuprimidos y no inmunosuprimidos infectados con *G. turgidum*. Las medias de depredación fueron de 3.5 ± 0.327 para la densidad 1:5, para la densidad 1:10 fue de 7.5 ± 0.681 , mientras que para la densidad 1:15 fue de 10.88 ± 1.025 . Al comparar las medias de depredación, se observó una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Aunque no hubo diferencia estadística en la carga parasitaria con la que los copépodos se infectaban (Kruskal Wallis= 0.849, J-T= 988.500, $p = 0.887$). El número de células leucocitarias en sangre varió de $64,250 \pm 1,750$ en los grupos controles a $354,500 \pm 18,945$ leucocitos/mm³ en tlacuaches infectados. Se estableció la especie de copépodo *M. edax* como el primer hospedero intermediario de *G. turgidum* en Sinaloa. Los factores que influyen en la determinación de copépodos como hospederos son la capacidad de detección de las presas de copépodos debido a la disturbancia generada por las presas al nadar, el tamaño del cuerpo está directamente relacionado con el número de parásitos que infectan copépodos. De acuerdo al conteo de células leucocitarias, el esquema de inmunosupresión funcionó, aunque no se observó diferencia estadística considerable en el conteo total, al realizar el conteo diferencial se observó la disminución del porcentaje de linfocitos y eosinófilos, lo que sugiere que el inmunosupresor actuó con selectividad celular o bien que, en el caso de los animales infectados, el parásito inmunomoduló la respuesta inmune del hospedero. Los resultados histológicos mostraron mayor exacerbación de daño necrótico, infiltrado inflamatorio predominantemente de neutrófilos en las zonas perinodulares de las lesiones causadas y fibrosis tanto en parénquima hepático como en submucosa y capa muscular de estómago en los animales infectados inmunosuprimidos que en los animales infectados no inmunosuprimidos. Los resultados sugieren que las alteraciones patológicas más exacerbadas en los animales inmunosuprimidos causadas por *G. turgidum* pudieron haber sido potenciadas por diferentes factores como el efecto del inmunosupresor, la inmunomodulación que *Gnathostoma* puede tener sobre el sistema inmunológico de *D. virginiana* o por el efecto polarizado que puede generar el estrés por cautiverio en animales silvestres. En conclusión, el daño histopatológico fue más exacerbado en animales inmunosuprimidos, lo que sugiere la importancia de la participación del sistema inmune durante la infección con *G. turgidum* y su expulsión.

Palabras clave: *Gnathostoma*, *Didelphis virginiana*, Inmunosupresión, Interacciones hospedero parásito, Respuesta inmune

II. ABSTRACT

Sinaloa state is an endemic area for two *Gnathostoma* species, where the opossum *Didelphis virginiana* is the definitive host of *G. turgidum* and some species of freshwater fish have been identified as intermediate hosts of *G. binucleatum*, currently recognized as a causative agent of the disease in humans. The complete life cycle of both species is still unknown, which makes it difficult to understand the behavior of the parasite during infection, also the possibility of implementing prevention and treatment strategies for the disease. In the present work, the host-parasite interaction was studied using *D. virginiana* infected with *G. turgidum* as an animal model. *Mesocyclops edax* copepods were evaluated as intermediate hosts of *G. turgidum* and the predatory capacity of copepods exposed to different larval of the second stage densities was evaluated. As second intermediate hosts were evaluated anura of the species *Rana pipens* during *in vitro* interaction with larvae of the third stage of *G. turgidum*. In addition, histological damage and the variation of the immune cell response in immunosuppressed and non-immunosuppressed infected opossums were evaluated. The predation means were 3.5 ± 0.327 for density 1:5, 7.5 ± 0.681 for density 1:10 and 10.88 ± 1.025 for density 1:15. When comparing predation means, a statistically significant difference was observed ($P < 0.05$). Although, there was no statistical difference in the parasitic load with which the copepods were infected (Kruskal Wallis= 0.849, J-T= 988.500, $p = 0.887$). The number of leukocyte cells in blood varied from $64,250 \pm 1,750$ in control groups to $354,500 \pm 18,945$ leukocytes/mm³ in infected opossums. The species of copepod *M. edax* was established as the first intermediate host of *G. turgidum* in Sinaloa. The factors that influence the determination of copepods as hosts are the ability to detect copepod prey due to the disturbance generated by the prey when swimming, body size is directly related to the number of parasites that infect copepods. According to the leukocyte cell count, the immunosuppression scheme worked, although no significant statistical difference was observed in the total count, when performing the differential count, the decrease in the percentage of lymphocytes and eosinophils was observed, suggesting that the immunosuppressant worked with cellular selectivity or that, in the case of infected animals, the parasite immunomodulated the host immune response. Histological results showed greater exacerbation of necrotic damage, inflammatory infiltrate predominantly of neutrophils in the perinodular areas of the lesions caused and fibrosis in both hepatic parenchyma and submucosa and stomach muscle layer in immunosuppressed infected animals than in non-immunosuppressed infected animals. The results suggest that the most exacerbated pathological alterations in immunosuppressed animals caused by *G. turgidum* may have been enhanced by different factors such as the effect of the immunosuppressant, the immunomodulation that *Gnathostoma* can have on the immune system of *D. virginiana* or because of the polarized effect that stress can generate in wild animals. In conclusion, histopathological damage was more exacerbated in immunosuppressed animals, suggesting the importance of the involvement of the immune system during infection with *G. turgidum* and its expulsion.

Key words: *Gnathostoma*, *Didelphis virginiana*, immunosuppression, host-parasite interaction, Immune response

III. INTRODUCCIÓN

La gnathostomosis humana es una de las enfermedades parasitarias emergentes, causadas por la infección con larvas del tercer estadio avanzado (L3A) de nemátodos del género *Gnathostoma*. La enfermedad en México se presenta principalmente como larva migrans cutánea (Díaz-Camacho y col. 1998). De las 13 especies de *Gnathostoma*, solo *G. spinigerum*, *G. hispidum*, *G. nipponicum* y *G. doloresi* han sido consideradas como agentes causales de gnathostomosis humana. *G. binucleatum* es el agente responsable de casos de gnathostomosis humana en México. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad pueden ser cutánea, visceral, neurológica o una combinación de estas (Lamothe-Argumedo, 2006; Vázquez Tsuji y col. 2006). Las personas adquieren la infección debido al consumo de carne de pescado dulceacuícola cruda o insuficientemente cocinada, infectada con L3A de *Gnathostoma* (Díaz-Camacho y col. 2003). Esta zoonosis es endémica en el sureste de Asia, donde Tailandia y Japón son los países más afectados. En Tailandia esta enfermedad constituye una de las principales causas de daños hemorrágicos intracraneales que puede conducir a la muerte del paciente (Díaz-Camacho y col. 2000). El agente etiológico y la enfermedad han sido descritos y reportados desde hace más de tres décadas en países como: Brasil, Argentina (Vázquez Tsuji y col. 2006), Perú, Guatemala, Ecuador, Colombia, México (Jiménez & Alva, 2009).

En México, la gnathostomosis se ha convertido en un serio problema de salud pública. En 1999 en el estado de Nayarit fueron reportados 1,090 casos por la secretaria de salud y en el 2000 el número de casos aumentó a 1,453. En 2003 fueron registrados más de 8000 casos en todo el país (Lamothe Argumedo, 2003), siendo la gnathostomosis cutánea la forma clínica más común de la enfermedad que se presenta con mayor frecuencia en los pacientes. En el

estado de Sinaloa la Unidad de Investigación en Salud Pública “Dra. Kaethe Wilms (UISP-FCQB-UAS), tiene registro de más de 10,000 casos (Comunicación personal). Estudios realizados por Díaz-Camacho y cols. (1998) enfocados en conocer la frecuencia de las manifestaciones clínicas de pacientes en Culiacán, se reportaron 300 personas con gnathostomosis, la mayoría (78.2%) presentaron típicas manifestaciones cutáneas con un edema inflamatorio en diferentes regiones del cuerpo. Se cree que la destrucción del tejido es debido a las lesiones mecánicas directas y por la liberación de toxinas, así como, una reacción inflamatoria producida contra la larva (Díaz-Camacho y col. 2000; Ramirez Avilay col. 2009). Sin embargo, no existen estudios suficientes que esclarezcan los cambios patológicos que el parásito causa en el humano.

Respecto al *Gnathostoma* en Sinaloa se registró un brote agudo de gnathostomosis causada por *G. binucleatum* (Díaz-Camacho y col. 2003). Posteriormente en 2009 se reportó un área endémica de *G. turgidum* en común con *G. binucleatum* en la comunidad de Tecualilla, municipio de Escuinapa. En estudios realizados en el área sobre posibles hospederos intermediarios o paraténicos, sólo se han encontrado L3A de *G. binucleatum* infectando intermediarios y paraténicos, en el caso de *G. turgidum* sólo se han registrado L3A y gusanos adultos en tlacuaches *Didelphis virginiana*, con una prevalencia alta en verano y extremadamente baja en invierno (Nawa y col. 2009). De esa manera, al parecer *G. binucleatum* y *G. turgidum* son especies simpátricas, aunque aún se desconoce el ciclo de vida completo para ambas especies en esta región.

Se han realizado estudios sobre la infección de *G. turgidum* en tlacuaches *D. virginiana* y se ha observado un claro corte sincronizado en el patrón de infección, con migración y maduración del gusano en el tejido del tlacuache hospedero, lo que sugiere que *G. turgidum* es

un parásito estacional en el área endémica reportada en el estado de Sinaloa (Nawa y col. 2009; Díaz-Camacho y col. 2010). En este sentido, estudios enfocados a monitorear los cambios biológicos y parasitológicos en tlacuaches *D. virginiana* infectados naturalmente con *G. turgidum* sugieren que probablemente *G. turgidum* es expulsado como resultado de mecanismos inmunológicos del hospedero, aunque la terminación del ciclo de vida del parásito no puede ser excluido como mediadores de un fenómeno de cura espontánea (Torres-Montoya y col. 2014). Sin embargo, la información sobre las características patológicas y parasitológicas es escasa, tanto en infecciones humanas como en hospedadores intermediarios y definitivos. *D. virginiana* ha sido reportado como el hospedero definitivo de *G. turgidum*, pero los efectos de la interacción de este parásito sobre el hospedero no han sido evaluados. Así mismo, se desconoce cuáles son los mecanismos y factores que intervienen en la selección e interacción hospedero-parásito.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Interacciones biológicas y parasitismo

El término hospedero-patógeno se refiere a las vías en que un patógeno interactúa con su hospedero. Virus, bacterias, priones, hongos, parásitos, entre otros, se adaptan a los cambios y encuentran vías alternativas para sobrevivir e infectar al hospedero. Estos patógenos son agentes infecciosos que causan enfermedades en el cuerpo del hospedero, principalmente cuando el sistema inmune falla en los mecanismos de defensa. La investigación respecto al estudio de la interacción hospedero parásito está enfocada a extender cómo funciona el patógeno, cómo entran en el cuerpo del hospedero, cómo evitan las barreras biológicas y cómo sobreviven los patógenos dentro del cuerpo del hospedero (Sen y col. 2016). Cuando se habla de la relación hospedero-parásito estamos tratando un tipo de asociación de dos protagonistas que desempeñan funciones activas y fundamentales (Rodríguez Diego y col. 2014).

Actualmente la investigación sobre la interacción hospedero patógeno es un campo emergente y en evolución. Cada vez que un patógeno es descubierto, su descubrimiento viene junto con el reto de encontrar estrategias para su prevención y cura. En ese sentido, unos niveles elevados de complejidades surgen cuando el parásito empieza a resistir los mecanismos de defensa del hospedero, ya que la población humana se encuentra en riesgo constante de adquirir infecciones persistentes, algunas de ellas incluso incrementan el riesgo de mortalidad. Por lo tanto, existe la necesidad de entender como los patógenos interactúan con sus hospederos, para el desarrollo de las estrategias preventivas y el desarrollo de terapias y medicamentos contra tales infecciones y enfermedades (Sen y col. 2016).

Una de las enfermedades parasitarias emergentes es la gnathostomosis humana causada por larvas del género *Gnathostoma*; dentro del género se encuentran clasificadas 13 especies, sin embargo, los ciclos biológicos, así como las interacciones con sus hospederos no han sido caracterizadas, por lo que se vuelve de importancia conocer los mecanismos que intervienen durante la interacción y de esa manera desarrollar estrategias y recomendaciones epidemiológicas.

4.2. Gnathostomosis humana

La gnathostomosis humana es una de las enfermedades parasitarias importantes transmitidas por alimentos, causadas por la infección con larvas de nematodo del género *Gnathostoma*. La enfermedad se caracteriza principalmente como larva migrans. De las 13 especies distintas, solo *G. spinigerum*, *G. hispidum*, *G. nipponicum* y *G. doloresi* han sido consideradas como las especies causantes de gnathostomosis humana. *G. binucleatum* es la especie responsable de casos de gnathostomosis humana en México. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad pueden ser cutánea, visceral, ocular, neurológica o una combinación de estas (Díaz Camacho y col. 1998).

La gnathostomosis cutánea se caracteriza por la presencia de edema migratorio intermitente. Este tipo de gnathostomosis presenta diferentes cuadros clínicos dependiendo de la profundidad de las capas de la piel donde se encuentre la larva (inflamatoria profunda, serpiginosa, pseudofurunculosa y mixta). La gnathostomosis visceral frecuentemente se presenta en hígado, pero también puede presentarse en otros órganos como pulmones, el aparato digestivo o genitourinario. Este cuadro clínico se manifiesta por la presencia de una tumoración dolorosa de lento crecimiento, se presenta dolor abdominal debido a la migración de la larva a través del hígado.

La gnathostomosis ocular va desde la disminución de la agudeza visual hasta el desprendimiento de la retina. El cuadro clínico inicia con edema palpebral y celulitis orbital. Al penetrar al globo ocular la larva ocasiona un intenso dolor, en forma súbita se pierde la agudeza visual, edema localizado de la retina, iritis, uveítis, vitreítis. Posteriormente se presenta edema de la córnea. Tiene como antecedente, casi siempre una forma cutánea, manifestándose por la presencia de edema migratorio principalmente en hombro, cuello y cara. Este tipo de gnathostomosis es fácil de diagnosticar y afecta tanto al hombre como a la mujer de todas las edades, y se presenta casi siempre de forma unilateral. Entre 1937 y 2005, 11 casos de gnathostomosis ocular fueron registrados, México ocupa el segundo lugar en casos de gnathostomosis ocular (Lamothe-Argumedo, 2006; Vázquez Tsuji y col. 2006).

La neurognathostomosis se manifiesta como una meningitis eosinófilica, caracterizada por cefalea intensa, paraplejia, retención de orina, con alteración de los pares craneales con parálisis facial, dificultad para deglutir, nistagmos, disartria, confusión mental, parálisis de extremidades, pérdida de conciencia como consecuencia de hidrocefalia obstructiva transitoria, o de hemorragia, coma y generalmente produce la muerte. No existen reportes de estos casos en nuestro país (Cuz Aubry, 2002; Lamothe-Argumedo, 2005; Vázquez Tsuji y col. 2006; Graeff Taexeira y col. 2009).

Esta zoonosis es endémica en el sureste de Asia, siendo Tailandia y Japón los países más afectados. En Tailandia esta enfermedad constituye una de las principales causas hemorrágicas intracraneales que puede conducir a la muerte del paciente (Díaz Camacho y col. 2000). El agente etiológico y la enfermedad han sido descritos y reportados desde hace más de tres décadas en países como: México, Ecuador, Colombia (Jiménez y Alva, 2009), Brasil, Argentina, Perú y Guatemala (Vázquez Tsuji y col, 2006).

En México, la gnathostomosis cutánea es la forma clínica más común de la enfermedad que se presenta con mayor frecuencia en los pacientes. En el caso de Sinaloa, estudios realizados por Díaz-Camacho y cols. (1998) con el fin de encontrar la frecuencia de las manifestaciones clínicas de pacientes en Culiacán, se observó que de 300 personas con presencia de gnathostomosis, el 78.2% presentaron típicas manifestaciones cutáneas con un edema inflamatorio en diferentes regiones de la piel. En nuestro país, la gnathostomosis se ha convertido en un serio problema de salud pública. En 1999 en el estado de Nayarit fueron reportados 1090 casos por la secretaria de salud y en el 2000 el número de casos aumento a 1453. En 2003 fueron registrados más de 8000 casos en todo el país (Lamothe-Argumedo, 2003). En el estado de Sinaloa la Unidad de Investigación en Salud Pública “Dra. Kaethe Willms (UISP-FCQB-UAS) estima más de 10,000 casos.

4.3. Respuesta inmunológica

Hasta el momento no existen estudios que demuestren que la larva de *Gnathostoma* pueda desarrollarse a gusano adulto en el humano; sin embargo, se cree que la destrucción del tejido es debido a las lesiones mecánicas directas y por la liberación proteasas por parte del parásito, así como, como una reacción inflamatoria producida contra la larva. Durante los primeros dos días se presenta un infiltrado perivascular de linfocitos e histiocitos con poca presencia de eosinófilos. Del tercer al sexto día se observa eosinofilia localizada entre los adipocitos. Del séptimo al décimo día, el panículo adiposo se encuentra completamente infiltrado con eosinófilos con escasa presencia de linfocitos. Los vasos sanguíneos se encuentran congestionados y se observan zonas hemorrágicas (Díaz Camacho y col., 2000; Ramírez Ávila y col., 2009).

Anantaphruti y cols. 2005 observaron que la larva de *Gnathostoma* induce en el hospedero la síntesis de anticuerpos específicos de clases IgG e IgE. Además, durante la migración de *Gnathostoma* por los tejidos se induce una respuesta tanto humoral como celular de tipo Th2 con liberación de interleucinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. También se libera el factor estimulador de colonias granulocíticas y monocíticas (GM-CSF) que induce la producción de IgE en células plasmáticas, induciendo la maduración de eosinófilos, sin embargo, se desconoce si algo similar puede ocurrir en animales silvestres infectados de manera natural (Díaz Camacho y col., 2000; Vázquez Tsuju y col., 2006).

El gusano adulto de *Gnathostoma* produce en sus hospederos definitivos lesiones en forma de nódulos en órganos por los cuales posee tropismo. Aunque sólo existe un estudio con descripción histopatológica de la lesión del parásito en su hospedero definitivo, se ha descrito que ocasiona un abundante infiltrado de células plasmáticas, macrófagos y eosinófilos al realizar cortes histológicos de nódulos gástricos de perros que fueron infectados experimentalmente con *G. binucleatum*. Las células inflamatorias fueron observadas alrededor de los huevos del gusano que se encontraban atrapados en el tejido lo que es probablemente el resultado de la capacidad antigénica de los huevos que contribuye al crecimiento de los nódulos. También se observó el aumento de los niveles de inmunoglobulinas, principalmente contra L3A donde el mayor título de anticuerpo se registró al quinto mes después de la infección esto puede ser debido a la estimulación antigénica de la larva causada por productos de secreción-excreción que se produce durante la migración a través de los tejidos (Álvarez Guerrero y cols. 2011).

4.4. Casos clínicos de gnathostomosis humana

En 2009 Herman reportó un caso de gnathostomosis humana en Londres, Inglaterra. La persona evaluada fue un británico de 41 años, que fue ingresado al Hospital de Enfermedades Tropicales (HTD por sus siglas en inglés), tres semanas después de regresar de Okavango Delta en Botswana. El paciente había nadado y bebido agua de río, en varias ocasiones, él también había ingerido carne cruda de brema. 2 semanas después reporto malestar abdominal intermitente, el dolor se movía a diferentes sitios y estaba acompañado por hinchazón palpable en su bazo que se resolvió después de 12 días, una masa subcutánea dolorosa desarrollada en la pared anterior del tórax. El paciente recibió un diagnóstico típico de gnathostomosis cutánea (Herman y col. 2009).

Así mismo en 2009 en China una mujer de 59 años recibió tratamiento por erupción progresiva y placas eritematosas asociadas con fiebre y síntomas sistemáticos. Ella tenía un historial de ingerir pescado de agua dulce poco cocido en Beijing 10 días antes de la admisión y no informo de viajes durante años anteriores. Los exámenes de sangre mostraron eosinofilia y los ultrasonidos detectaron múltiples aéreas hiperecóticas en el hígado y bazo. El diagnóstico fue realizado mediante la prueba de Western blot para detectar anticuerpos específicos de la larva de *G. spinigerum*. Posteriormente 32 casos fueron reportados en la provincia de China (Ming Li y col. 2009).

En México entre diciembre de 1993 y julio de 1997, 98 pacientes con síntomas de gnathostomosis fueron identificados en consultas externas de los Servicios de Dermatología y Alergias, Hospital Regional “Vicente Guerrero” IMSS. El diagnóstico fue realizado por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés) y Western blot usando antígenos de gusanos recuperados de biopsias de pacientes o del musculo de peces de

agua dulce *Dormilatum latrifons* (Rojas-Molina y col. 1999). En Sinaloa entre 1992 y 1995 un total de 300 casos de gnathostomosis fueron registrados en el municipio de Culiacán. Los pacientes fueron diagnosticados mediante ensayo de ELISA, además en este estudio se realizó una búsqueda para identificar la fuente de infección en hospederos paraténicos regionales como peces de agua dulce y especies de aves. 14 larvas de *Gnathostoma* se encontraron en 4 especies de aves (*Egretta alba*, *Pelecanus erythrorhynchos*, *Pelecanus occidentalis*, *Ardea herodias*); sin embargo, no se encontraron larvas en ninguna de las especies de peces examinadas (Díaz Camacho y col. 1998).

Cinco años más tarde se reportan cinco casos de pacientes adultos que tenían un episodio agudo de vómito y dolor abdominal minutos después de haber comido ceviche de pescado (*Eleotris picta*) de un lago en el sur del estado de Sinaloa. Los pacientes experimentaron dolor agudo de garganta, pecho, articulaciones, dolor de cabeza y fiebre. Un paciente de 55 años de edad fue hospitalizado con sospechas de pancreatitis o neumonía. 9 días después los pacientes desarrollaron entre tres y 12 edemas, lesiones migrantes en la piel de la espalda, abdomen, extremidades superiores e inferiores, cara, ojos y el cuero cabelludo. Todos los pacientes fueron sero-positivos a antígenos de *G. doloresi* y tenían elevados niveles de IgE. Dos pacientes presentaron eosinofilia. Los pacientes vivían en una comunidad agrícola y pesquera, en donde posteriormente se realizó un estudio sero-epidemiológico y un estudio de las condiciones de vida en una muestra de 309 individuos distribuidos en 74 hogares. El consumo de pescado crudo se reportó en el 36% de los hogares y 12 individuos tenían historial de lesiones migrantes en la piel. La sero-prevalencia para antígenos de *Gnathostoma* fue de 34.95%. Además, un total de 563 peces obtenidos de un lago y un estuario se examinaron y cinco especies se encontraban infectados con L3A de *Gnathostoma*. Las especies de peses

fueron *Dormitator latifrons*, *Cichlasoma beani*, *Oreochromis spp.* y *Eleotris picta*. Estas especies de peces que habían sido consumidas por los 5 pacientes con gnathostomosis aguda (Díaz Camacho y col. 2003).

4.5. Taxonomía y etiología de Gnathostoma

Se han identificado más de 20 especies del género *Gnathostoma* que infectan a mamíferos, Owen en 1836 incluyó 11 especies de *Gnathostoma* principalmente distribuidas en Asia y América. En México, 3 especies han sido registradas: *G. turgidum* de tlacuaches registrada por Stossich en 1902, *G. binucleatum* de félidos y cánidos registrada por (Acosta-Hernández y col. 1994) y por último Chandler en 1942 registro a *G. procyonis* de mapaches (Bertoni-Ruiz y col. 2005). Algunos autores reconocen 13 especies de este género y recientemente se ha considerado a *G. braziliensis* y *G. didelphis* como sinónimo de *G. turgidum*, por lo que el número de especies se sugiere sea reducido a 12 (García-Márquez, 2005; Nawa y col. 2009; Bertoni Ruiz y col. 2011).

G. spinigerum, *G. hispidum*, *G. nipponicum* y *G. doloresi* se han identificado en Asia como especies causantes de enfermedad en humanos (Nawa & Nakamura, 2004) mientras que *G. binucleatum* ha sido la única especie relacionada con la gnathostomosis humana en América. Recientemente se ha sugerido a *G. lamohtei* como un nuevo agente etiológico de la gnathostomosis humana en México luego del hallazgo de larvas del parásito en peces utilizados para el comercio en el estado de Tabasco; sin embargo, la capacidad del parásito para producir la enfermedad en humanos no se ha confirmado (Álvarez-Guerrero y col. 2011; Gaspar-Navarro y col. 2013).

Con respecto al parásito en México, Caballero y Caballero (1958) describió *Gnathostoma sp* por primera vez en el estómago de *Didelphis marsupialis* en Chiapas, después

identificada como *G. spinigerum*, posteriormente este parásito fue reclasificado como *G. turgidum*. Subsecuentemente, *G. turgidum* fue encontrado en los ojos de 4 tlacuaches grises, *Philander oposum* y también en el estómago de *D. virginiana*, ambos en Oaxaca y Guerrero. A lo largo de la historia de *G. turgidum* los reportes en diferentes aéreas del continente americano incluían solo a algunos gusanos en uno o algunos tlacuaches (Lamothe-Argumedo y col. 1998).

4.6. Distribución de *Gnathostoma* en México

La gnathostomosis humana en México ha sido reportada en Nayarit, Sinaloa, Oaxaca, Veracruz, Tamaulipas, Guerrero, Distrito Federal, Chiapas, Morelos, Jalisco, Quintana Roo, Tabasco, Tamaulipas, Yucatán (Cruz Aubry, 2002; Pérez Álvarez y col., 2008) (Fig. 1). Esta enfermedad constituye un mayor problema emergente de salud en el estado de Nayarit, donde un total de 6328 casos fueron reportados entre 1995 y 2005 (Álvarez Guerrero y col., 2011).

Actualmente tres especies de nemátodos del género *Gnathostoma* en animales silvestres han sido identificados en México: *Gnathostoma lamothei*, *Gnathostoma binucleatum* y *Gnathostoma turgidum* (Díaz-Camacho y col., 2010). *G. binucleatum* ha sido identificado en 19 zonas de 8 estados; Sinaloa, Nayarit, Veracruz, Oaxaca, Yucatán, Quintana Roo, Tabasco y Guerrero, estados en los cuales en su mayoría además de haber encontrado al parásito en diversos animales, también se han registrado casos de gnathostomosis humana. Por otra parte, *Gnathostoma turgidum* ha sido registrado en 18 zonas de 8 estados; Sinaloa, Nayarit, Veracruz, Guerrero, Tabasco, Chiapas, Oaxaca y Morelos (Figura 2).

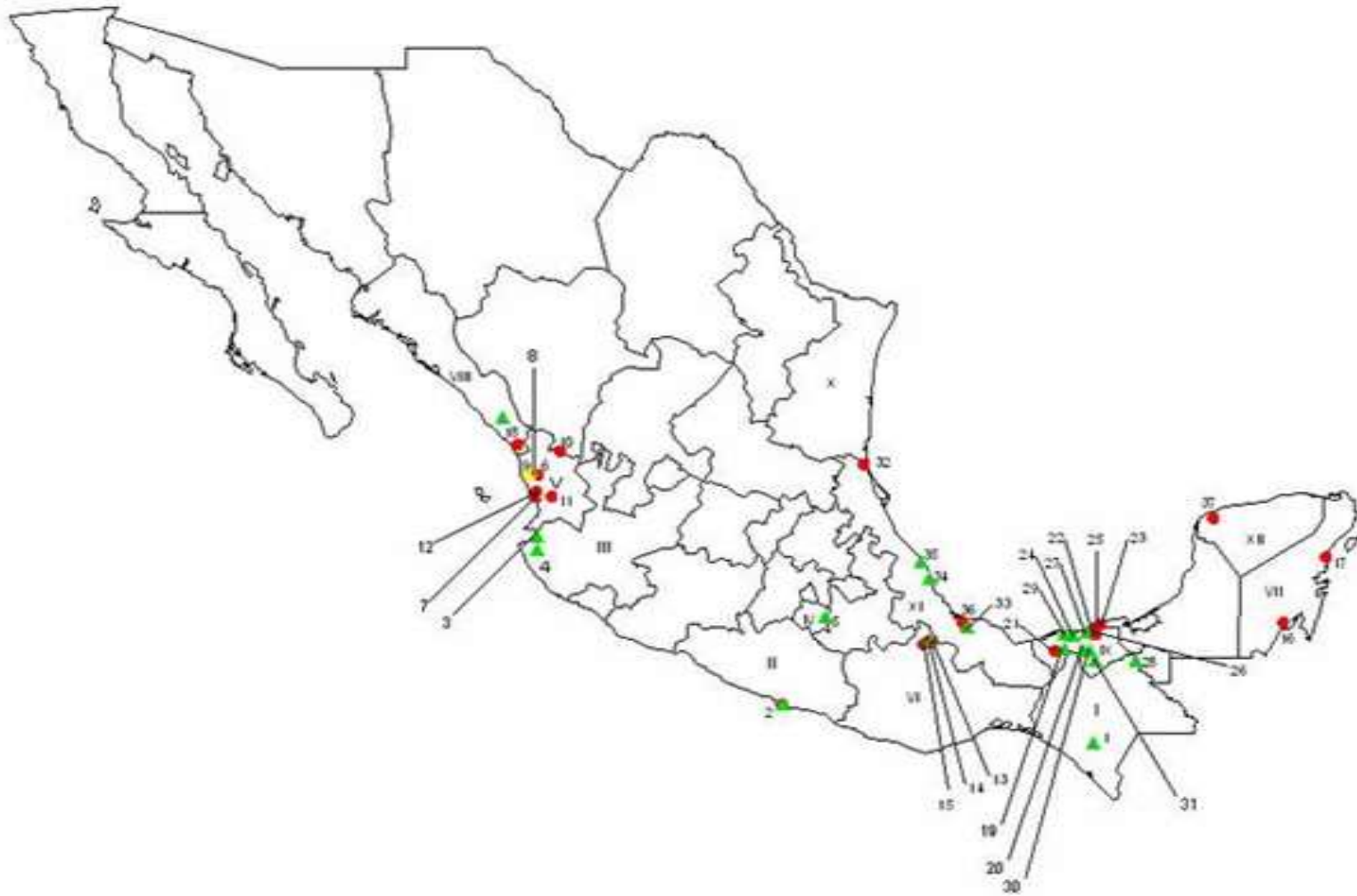


Figura 1. Distribución geográfica de *G. binucleatum* y *G. turgidum* en México. *Gnathostoma binucleatum* (●) y *Gnathostoma turgidum* (▲): I) Chiapas, II) Guerrero, III) Jalisco, IV) Morelos, V) Nayarit, VI) Oaxaca, VII) Quintana Roo, VIII) Sinaloa, IX) Tamaulipas, X) Veracruz, XI) Yucatán.

Fuente: Pérez Álvarez, 2000.

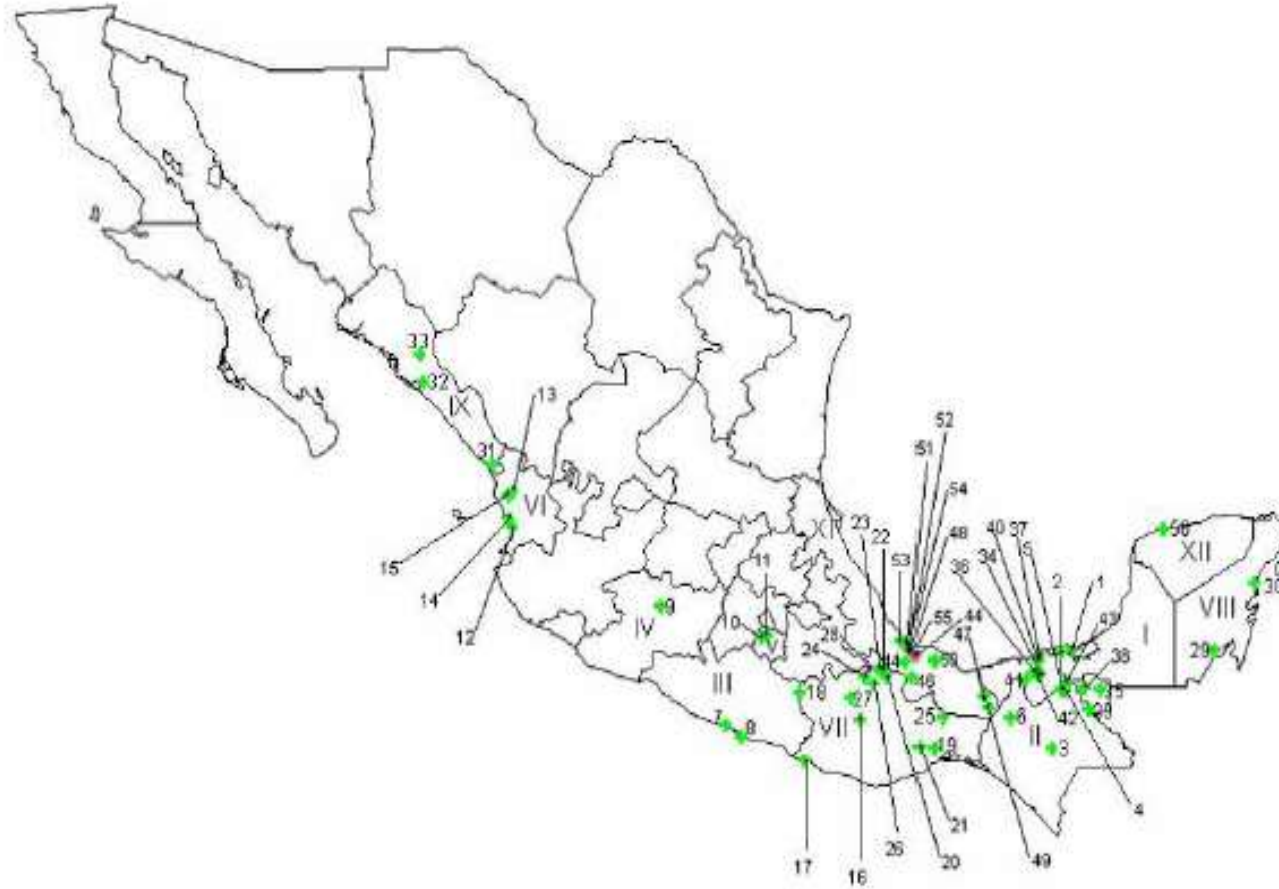


Figura 2. Distribución de *Gnathostoma lamothei* y *Gnathostoma spp.* *Gnathostoma lamothei* (●) y *Gnathostoma spp.*(+). Los numero romanos indican los estados de México en el mapa; Los números arábigos muestran la posición de cada localidad en el mapa: I) Campeche: 1, 2. II) Chiapas: 3, 4, 5, 6. III) Guerrero: 7, 8. IV) Michoacán: 9. V) Morelos: 10, 11. VI) Nayarit: 12, 13, 14, 15. VII) Oaxaca: 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28. VIII) Quintana Roo: 29, 30. IX) Sinaloa: 31, 32, 33. X) Tabasco: 34, 35, 36, , 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43. XI) Veracruz: 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55. XII) Yucatán: 56.

Fuente: modificado de Pérez-Álvarez, 2008.

4.7. Morfología del género *Gnathostoma*

4.7.1. Adulto

El gusano adulto posee un cuerpo cilíndrico cuya longitud varía de acuerdo con la edad. En la parte anterior posee un bulbo cefálico armado con 8 a 10 hileras de espinas transversales, aunque puede variar según la especie. En la superficie del bulbo cefálico se pueden observar un par de labios que rodean a una cavidad alargada en forma de boca. El cuerpo se encuentra totalmente cubierto con espinas cuticulares las cuales disminuyen su densidad y tamaño conforme se alejan gradualmente del bulbo cefálico, pero no desaparecen. Dichas espinas varían en distribución, forma y tamaño de acuerdo con la región del cuerpo del gusano y de la especie de *Gnathostoma* (Figura 3) (Díaz-Camacho y col., 2000, Bertoni-Ruiz y col., 2011).

4.7.2. Larva del tercer estadio avanzado (L3A)

Las larvas poseen cuerpo cilíndrico, con una longitud variante entre los 3 a 4.7 mm de longitud. En la porción anterior presentan un bulbo cefálico, con tres o cuatro hileras de ganchos. En la parte frontal del bulbo cefálico posee una cavidad rodeada por dos labios semicirculares voluminosos con un par de papilas cada uno. El esófago que continúa de la boca se comunica con el intestino, el cual termina en un poro anal, hacia la región ventral del cuerpo. El cuerpo cilíndrico tiene alrededor de 200 hileras de espinas las cuales disminuyen en talla y número conforme se alejan del bulbo cefálico. Entre las hileras de espinas número 12-13 y 14-15 se encuentra una papila cervical de aproximadamente 4.4 micras y en la parte inferior hacia las hileras 30-32, se encuentra un poro excretor (Díaz-Camacho y col., 2000). Posee sacos cervicales donde se sugiere que contiene enzimas digestivas que le permiten al parásito migrar a través del tejido con mayor facilidad. Es poco lo que se conoce sobre la

diversidad y cantidad de enzimas que presenta el parásito, hasta el momento son tres las proteínas bien descritas y caracterizadas, Catepsina L, Serin proteasa y una Proteína tipo metaloproteasa, las tres identificadas en *G. spinigerum*, las cuales posiblemente no son exclusivas de la especie (Fig. 4). Estas proteínas participan en general en la degradación de otras proteínas del huésped, brindando nutrientes al parásito, ayudándolo a atravesar tejidos y rompiendo las moléculas efectoras del sistema inmunitario del individuo afectado.

4.7.3. *Morfología del huevo*

Los huevos fertilizados de *Gnathostoma* son ovalados, de color amarillo o café claro, miden aproximadamente 70 por 40 μm , están rodeados de una pared gruesa con uno o dos opérculos polares (Fig. 5) (Díaz-Camacho y col., 2000). A pesar de poseer características similares, los huevos de algunas especies de *Gnathostoma* pueden diferenciarse en base a sus opérculos polares y en base a las características de la membrana del huevo. Un claro ejemplo de ello es *G. binucleatum* y *G. turgidum*, el primero presenta solo un opérculo polar y una membrana lisa, a diferencia de *G. turgidum*, que presenta dos opérculos polares y una membrana con orificios.

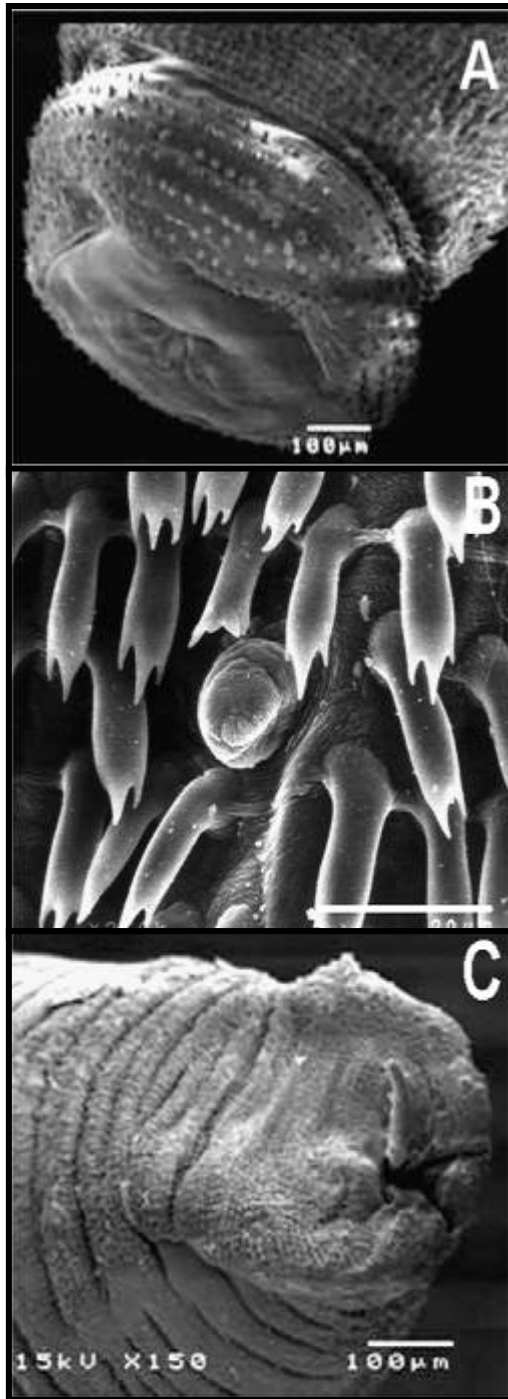


Figura 3. Fotomicrografía electrónica de barrido del gusano adulto de *G. binucleatum*. Se observa el bulbo cefálico de un adulto de *G. binucleatum* (A), Papila cervical rodeada espinas localizada en porción corporal media (B) y la espícula peneana del macho en porción terminal del cuerpo del gusano (C).

Fuente: Álvarez -Guerrero, 2010

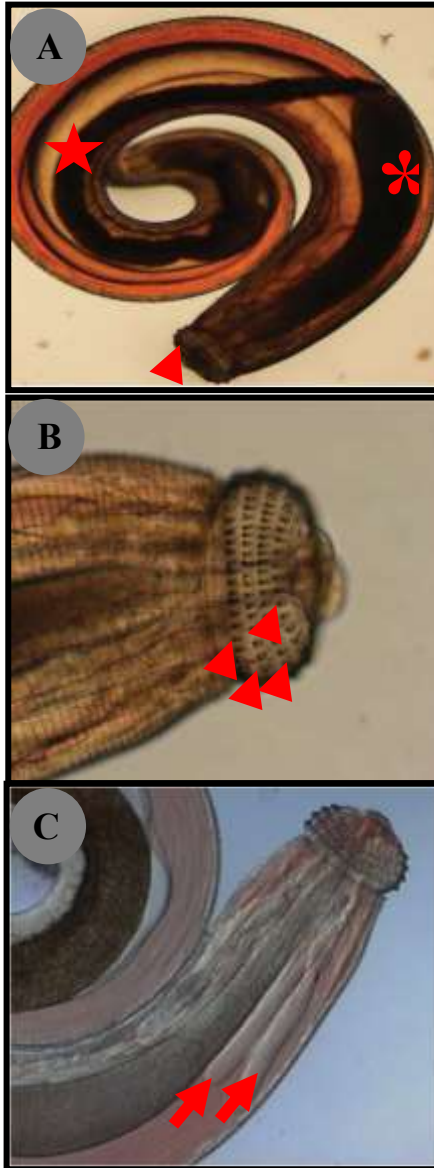
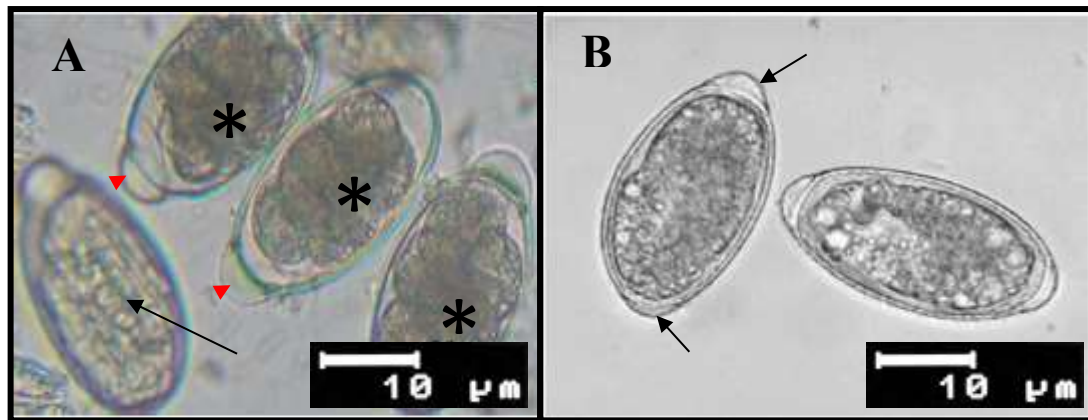


Figura 4. Larva de tercer estadio avanzada de *Gnathostoma sp.* A) imagen que muestra una larva completa de *G. spinigerum*, la cabeza de flecha marca el bulbo cefálico, el asterisco el esófago y la estrella el intestino. B) bulbo cefálico de larva de *G. spinigerum*, las cabezas de flecha marcan 4 hileras de ganchos. C) larva de *G. binucleatum*. Las flechas señalan los sacos cervicales que rodean los labios succionadores del bulbo cefálico.

Fuente: Modificada de Herman 2009.

Figura 5.
Huevos de
Gna



thostoma sp. A) Huevos de *G. binucleatum* embrionado (*) y larvado (flecha) donde se observan el opérculo polar (cabeza de flecha). B) Huevos de *G. turgidum* embrionado. Las flechas muestran los opérculos polares.

Fuente: Modificada de Álvarez Guerrero 2011; Díaz-Camacho y col. 2008.

4.8. Ciclo de vida de *Gnathostoma*

El ciclo de vida de las especies de *Gnathostoma* es similar, con diferencias en los hospederos intermediarios y hospederos definitivos, requerido para completar el ciclo. Los parásitos adultos viven en el esófago, estómago o riñón de los hospederos definitivos de varios

mamíferos salvajes y domésticos. Los huevos no embrionados de *Gnathostoma* son descargados en las heces de los hospederos definitivos en cuerpos de agua dulce o salobre, una vez en el agua las larvas del primer estadio (L1) se desarrollan dentro del el huevo, después de la eclosión se le considera larva del segundo estadio (L2). Esta es ingerida por el primer hospedero intermediario, copépodos de diferentes géneros como *Cyclops*, *Euscyclops*, *Mesocyclops*, *Tropocyclops* y *Acantocyclops*, donde el parásito se desarrolla a larva del tercer estadio temprano (L3T). Diversos peces se convierten en segundos hospederos intermediarios al ingerir copépodos infectados. La L3T es liberada en el estómago del segundo hospedero intermediario que pueden ser peces, anfibios y reptiles, posterior a liberarse migra principalmente al musculo esquelético donde la L3T se enquista y se convierte a L3A. Los peces infectados son comidos por hospederos paraténicos vertebrados; ranas, serpientes, aves ictiófagas y pequeños mamíferos. El ciclo se completa cuando el hospedero definitivo come a alguno de los hospederos paraténicos o segundos hospederos intermediarios infectados con L3A. En los hospederos definitivos la L3A es liberada en el estómago y migra a los órganos por los que tiene tropismo para madurar a gusano adulto (Díaz, 2015). Es importante destacar que la L3A es el estadio infectivo para humanos principalmente por ingestión de carne cruda o insuficientemente cocida de los hospederos paraténicos o segundos hospederos intermediarios, aunque existen reportes de personas que han adquirido la infección por el consumo de agua con copépodos infectados con L3T de *Gnathostoma*.

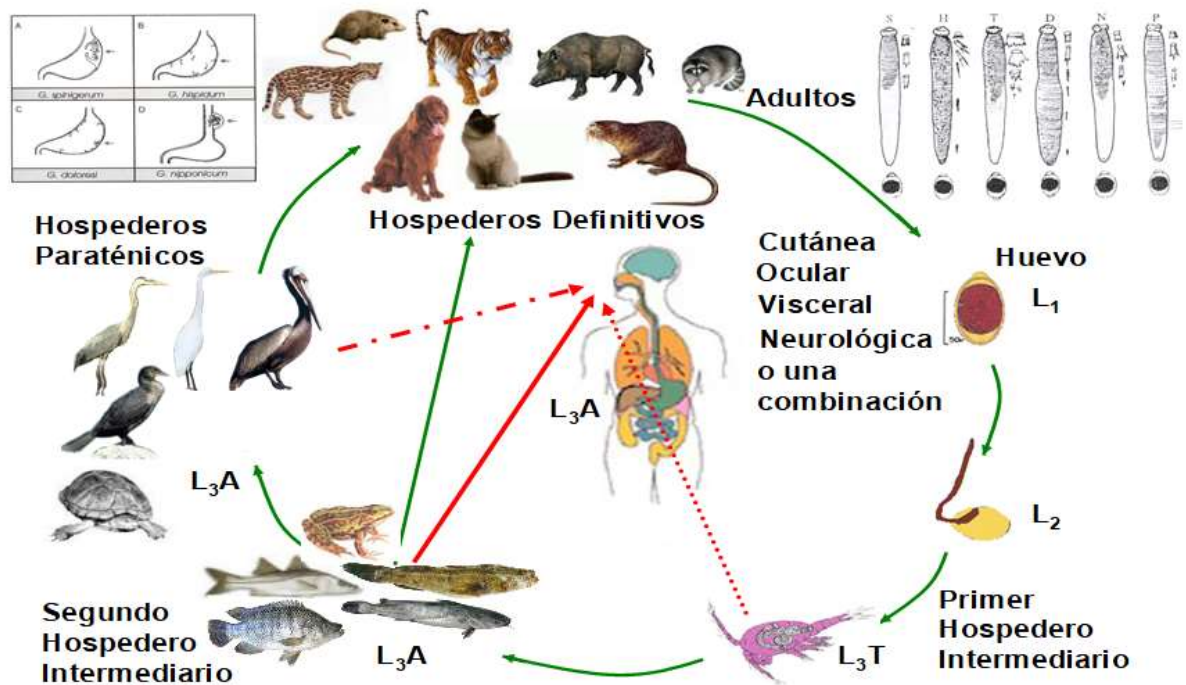


Figura 6. Ciclo de vida *Gnathostoma*. El ciclo inicia con la expulsión de huevos de *Gnathostoma* en las heces de vertebrados mamíferos, los huevos embrionan en cuerpos de agua dulce o salobre y se desarrolla la L1, la cual es ingerida por los primeros hospederos intermediarios que son microcrustáceos, donde la larva se desarrolla a L3T. Los microcrustáceos infectados son comidos por los segundos hospederos intermediarios que pueden ser vertebrados anfibios y peces, en ellos la larva se transforma en L3A que se enquistada en el músculo esquelético del hospedero. El ciclo se completa cuando la L3A se establece en el estómago del hospedero definitivo al consumir carne de los segundos hospederos infectados. En el estómago las larvas se desarrollarán a estadios maduros, se reproducirán sexualmente e iniciarán el ciclo de nuevo con la ovoposición. Existen dos destinos alternativos de las L3A: 1) ser consumidas por hospederos paraténicos, 2) ser consumidas por seres humanos, en este caso las personas desarrollarán algunas de las variantes clínicas de la gnathostomosis o una combinación de ellas.

4.9. Antecedentes

4.9.1. Estudios en Sinaloa sobre la biología y ciclo de vida de *Gnathostoma*

Desde hace más de una década la gnathostomosis humana y el agente etiológico han sido estudiadas en el estado de Sinaloa, siendo identificadas 2 especies de *Gnathostoma*: *G. binucleatum* y *G. turgidum* en diferentes hospederos. Diversas especies de animales han sido capturadas y examinadas en el estado con el fin de establecer las especies que intervienen en el ciclo de vida de estos parásitos. En el caso de *G. binucleatum*, se ha descrito que existen diversas especies de peces, aves y reptiles que actúan como segundos hospederos intermediarios durante el ciclo de vida, así como hospederos paraténicos (Cuadro 1.) Pese a estos esfuerzos de investigación, aún se desconoce el o los primeros hospederos intermediarios, así como el hospedero definitivo de *G. binucleatum* (Díaz-Camacho y col. 2010).

Por otra parte, gusanos adultos del parásito *G. turgidum* han sido extraídos del estómago, hígado y pulmón de *Didelphis virginiana*. En 2009 en Sinaloa se reportó un área endémica de *G. turgidum* en común con *G. binucleatum* en la comunidad de Tecualilla, municipio de Escuinapa, donde también se registró un brote agudo de gnathostomosis causada por *G. binucleatum*. En el área se encontró *G. turgidum* en tlacuaches, también se detectaron L3A de *G. binucleatum* con extremada prevalencia en peces estuarinos. En extensivos estudios sobre posibles hospederos para ambas especies, sólo se han encontrado L3A de *G. binucleatum* en peces que fungen como segundos hospederos intermediarios, pero hasta el momento se desconocen las especies que participan en el ciclo como primer hospedero intermediario y hospedero definitivo para esta especie de *Gnathostoma*. En el caso de *G. turgidum* se ha observado una prevalencia alta en tlacuaches durante la estación de verano y

una prevalencia extremadamente baja durante el invierno en el área endémica. Al compartir área de distribución se ha sugerido que estas dos especies son simpátricas. Después de realizar estudios sobre la infección de *G. turgidum* en tlacuaches, se ha sugerido un claro corte sincronizado en el patrón de infección, con migración y maduración del gusano en tejidos del tlacuache hospedero (principalmente hígado y estómago) y posteriormente ausencia de infección, por lo que se ha propuesto que *G. turgidum* es un parásito anual en el área endémica reportada en el estado de Sinaloa (Nawa y col. 2009; Díaz-Camacho y col. 2010).

Se han realizado estudios para monitorear los cambios biológicos y parasitológicos en tlacuaches *D. virginiana* infectados de forma natural con *G. turgidum* mediante exámenes coproparasitoscópicos y ultrasonidos abdominales que sugieren que *G. turgidum* es expulsado como resultado de mecanismos inmunológicos del hospedero, aunque la terminación del ciclo de vida del parásito no puede ser excluido (Torres-Montoya y col. 2014). Recientemente nuestro grupo de investigación realizó un estudio histopatológico de hígado, estómago e intestino de *D. virginiana* infectados con *G. turgidum*. Se observó la presencia de células inflamatorias y la hiperplasia de células caliciformes en intestino. Además, en los cortes histológicos de hígado se observó un proceso fibrótico con la presencia de puentes de colágeno entre las estructuras porta, zonas de necrosis alrededor de la lesión nodular causada por el parásito.

Cuadro 1. Hospederos intermediarios, paraténicos y definitivos de *Gnathostoma*, identificados en Sinaloa.

SEGUNDOS HOSPEDEROS INTERMEDIARIOS			
HOSPEDERO	LOCALIZACIÓN	ESTADIO	REFERENCIA
<i>Arius guatemalensis</i>	Tejido muscular	L3A	Díaz Camacho <i>col.</i> , 2002
<i>Dormitator latifrons</i>	Tejido muscular	L3A	Díaz Camacho <i>col.</i> , 2002
<i>Gobiomorus sp</i>	Tejido muscular	L3A	Díaz Camacho <i>col.</i> , 2002
<i>Oreochromis sp.</i>	Tejido muscular	L3A	Díaz Camacho <i>col.</i> , 2002
<i>Cichlasoma beani</i>	Tejido muscular	L3A	Díaz Camacho <i>col.</i> , 2002
<i>Eleotris picta</i>	Tejido muscular	L3A	Díaz Camacho <i>col.</i> , 2002
<i>Sciades guatemalensis</i>	Tejido muscular	L3A	Díaz Camacho y <i>col.</i> , 2002
<i>Arius guatemalensis</i>	Tejido muscular	L3A	Díaz Camacho y <i>col.</i> , 2002
<i>Centropomus nigrescens</i>	Tejido muscular	L3A	Díaz Camacho y <i>col.</i> , 2002
<i>Cathorops fuerthii</i>	Tejido muscular	L3A	Díaz Camacho y <i>col.</i> , 2007
<i>Pomadasys macracanthus</i>	Tejido muscular	L3A	Díaz Camacho y <i>col.</i> , 2007
<i>Migil curema</i>	Tejido muscular	L3A	Díaz Camacho y <i>col.</i> , 2007
<i>Oreochromis aureus</i>	Tejido muscular	L3A	Díaz Camacho y <i>col.</i> , 2007
<i>Chanos chanos</i>	Tejido muscular	L3A	Díaz Camacho y <i>col.</i> , 2007

HOSPEDEROS PARATÉNICOS			
HOSPEDERO	LOCALIZACIÓN	ESTADIO	REFERENCIA

<i>Ardea herodias</i>	Tejido muscular	L3A	Díaz Camacho y col., 2002
<i>Egretta thula</i>	Tejido muscular	L3A	Díaz Camacho y col., 2002
<i>Phalacrocorax olivaceus</i>	Tejido muscular	L3A	Díaz Camacho col., 2002
<i>Pelecanus occidentalis</i>	Tejido muscular	L3A	Díaz Camacho col., 2002
<i>Pelecanus erythrorhynchos</i>	Tejido muscular	L3A	Díaz Camacho col., 2002
<i>Ardea alba</i>	Tejido muscular	L3A	Koga y col., 2000
<i>Ardea herodias</i>	Tejido muscular	L3A	Díaz Camacho col., 2002
<i>Chochlarius chochlarius</i>	Tejido muscular	L3A	Díaz Camacho col. 2002
<i>Anhinga anhinga</i>	Tejido muscular	L3A	Díaz Camacho col. 2002
<i>Nycticorax nycticorax</i>	Tejido muscular	L3A	Díaz Camacho col. 2002
<i>Trachemys scripta</i>	Tejido muscular	L3A	Díaz Camacho col., 2010
<i>Kinosternon integrum</i>	Tejido muscular	L3A	Díaz Camacho col., 2010
<i>Ardea herodias</i>	Tejido muscular	L3A	Díaz Camacho y col., 2002
<i>Egretta thula</i>	Tejido muscular	L3A	Díaz Camacho y col., 2002

HOSPEDERO DEFINITIVO			
HOSPEDERO	LOCALIZACIÓN	ESTADIO	REFERENCIA
<i>Didelphis virginiana</i>	Hígado	L3A, Juvenil,	Díaz Camacho col., 2008
	Estómago	Adulto	

Así mismo, se observaban zonas necróticas con infiltrado de células inflamatorias en zonas por las que la larva había migrado. Esas características parecen mantenerse en tejido hepático de los tlacuaches que habían resuelto la infección. En ese sentido, se sugiere que esas alteraciones podrían estar siendo ocasionadas por el estímulo antigénico ocasionado por residuos que el parásito deja durante su migración y que podrían ser difíciles de degradar por el sistema inmunológico del tlacuache (Torres-Montoya y col. 2017). Existen escasos estudios sobre los efectos de la interacción de las especies de *Gnathostoma* y sus hospederos. Sin embargo, la información sobre las características patológicas y parasitológicas, tanto en infecciones humanas como en hospedadores intermediarios y definitivos es insuficiente. Tomando en cuenta estos antecedentes y aunque *G. binucleatum* es el agente causal reportado en casos de gnathostomosis humana en México, la histopatología de las lesiones ha sido pobremente descrita, por la dificultad de localizar al parásito debido a su comportamiento migratorio en humanos, además, no está claro si *G. turgidum* podría eventualmente estar involucrado como agente de gnathostomosis humana. En ese sentido, son necesarios más estudios para entender mejor el ciclo de vida del parásito y conocer los cambios patológicos durante las interacciones del parásito en sus hospederos naturales, esto podría contribuir a clarificar el comportamiento del parásito en infecciones humanas.

4.9.2. *Infecciones experimentales de hospederos intermediarios y modelos animales con Gnathostoma*

4.9.2.1. *Infecciones experimentales en posibles hospederos intermediarios de Gnathostoma*

En estudios previos se han evaluado experimentalmente a posibles hospederos intermediarios de *Gnathostoma*. Almeyda-Artigas y col. en 1995 evaluaron el desarrollo de

larvas L3T de *G. binucleatum* en cyclopoideos como posibles primeros hospederos intermediarios. 8 especies de copépodos fueron susceptibles a la infección y se observó que la intensidad de infección fue de 1-3 larvas por copépodo, así como el desarrollo completo de las L3T (Almeyda-Artigas y col. 1995). Se ha observado el desarrollo de larvas L3T de *G. spinigerum* en copépodos de la especie *M. aspercornis*, además del desarrollo morfológico de la L3T, se evidenció que la intensidad de la infección fue de un rango de 1-13 larvas por copépodo y que la densidad de la infección fue proporcionalmente negativa al desarrollo de las larvas (Janwan y col. 2011).

En 2013 fue reportado el desarrollo in vitro larvas L3T de *G. turgidum* en copépodos del género *Mesocyclops*, aunque se sugiere que es necesario esclarecer las especies del género que son susceptibles a la infección como primeros hospederos (Mosqueda-Cabrera y col. 2010). Por otra parte, ranas de la especie *Lithobates heckscheri* han sido reportadas como segundos hospederos intermediarios de *G. lamoyhei*; tras realizar una infección experimental, en 2 ranas fueron observadas 248 larvas L3A de *G. lamoyhei* en hígado y tejido muscular (Gaspar-Navarro y col. 2013).

4.9.2.2. Infecciones experimentales con *Gnathostoma* en modelos animales

Algunas investigaciones han sido enfocadas a establecer modelos animales en infecciones experimentales con *Gnathostoma* para el estudio de características patológicas de la gnathostomosis y el esclarecimiento de posibles hospederos definitivos que contribuyan al entendimiento del ciclo de vida del parásito. En ese sentido, fue evaluada la activación de linfocitos T en ratones ante el estímulo antigénico de *G. spinigerum*; se observó que la respuesta deprimida a la estimulación específica de *Gnathostoma* es dependiente de la dosis e infección crónica (Saksirisampant y col. 2012).

Se ha propuesto que cánidos y felinos domésticos pueden ser hospederos definitivos de *G. binucleatum*; sin embargo, al ser evaluados fueron poco susceptibles a la infección. Por una parte, sólo 1 de 4 perras sometidas a infección experimental con larvas de *G. binucleatum* desarrollo un nódulo vascular fibrótico en el estómago, con la presencia de un gusano juvenil. Así mismo, ninguno de los gatos sometidos a infección experimental fue coproparasitoscópicamente positivo durante el periodo de estudio, solo un gato desarrollo un nódulo fibrótico en estómago con la presencia de L3A dentro de la lesión. Debido a esos hallazgos se ha sugerido que félidos y cánidos domésticos son poco viables como hospederos definitivos de *G. binucleatum* y como modelos animales para el estudio de la gnathostomosis (Álvarez-Guerrero y col. 2014).

García- Márquez y colaboradores estudiaron la respuesta inflamatoria ocasionada por *Gnathostoma* en vertebrados de México. Clasificaron las lesiones en cuatro categorías; peces anfibios y reptiles infectados desarrollaron lesiones de las categorías I y II (sin lesión o lesión mínima), las aves desarrollaron lesiones de categoría II, III y IV (lesión mínima, moderada y granulomatosa), en el estudio fueron incluidas una biopsia de humano con gnathostomosis y una muestra de tejido estomacal de un tlacuache *D. virginiana* infectado con *G. turgidum*, en ambos tejidos se observó lesiones de categoría III y IV (lesión moderada a intensa y granulomatosa) (García-Márquez y col. 2014). Sin embargo, aunque se ha intentado infecciones en modelos animales para el estudio y mejor entendimiento de la patogénesis de la gnathostomosis, así como el estudio del ciclo biológico del parásito, aun es necesario establecer un modelo viable, por lo que algunos investigadores sugieren continuar con el estudio que permitan establecer posibles modelos animales.

V. JUSTIFICACIÓN

México actualmente es reconocido como un país endémico de gnathostomosis y Sinaloa fue reportada área endémica de gnathostomosis humana, donde *G. binucleatum* y *G. turgidum* han sido reportados como especies simpátricas. En el caso de *G. binucleatum* se ha identificado como el agente causal de la enfermedad en humanos. Así mismo, *G. turgidum* se ha descrito como parásito de *Didelphis virginiana*, aunque hasta el momento se desconoce si *G. turgidum* puede ocasionar patologías en humanos. Se ha establecido a *D. virginiana* como el hospedero definitivo de *G. turgidum* y algunas especies de peces dulceacuícolas como intermediarios de *G. binucleatum*, aún se desconoce el ciclo de vida completo de ambas especies. Estos hechos dificultan el entendimiento sobre el comportamiento del parásito durante la infección, también la posibilidad de implementar estrategias de prevención control y tratamiento para la ocurrencia de la enfermedad. Además, los mecanismos patológicos y parasitológicos de la enfermedad han sido pobremente descritos, principalmente por la dificultad de localizar al parásito debido a su comportamiento migratorio en humanos. En ese sentido, son necesarios más estudios enfocados a entender el ciclo de vida del parásito y conocer los cambios patológicos durante las interacciones con sus hospederos naturales. La información generada podría contribuir a clarificar el comportamiento del parásito en infecciones humanas y los mecanismos de mantenimiento del ciclo de vida en vida silvestre en zonas endémicas con población humana en riesgo de la adquisición de la infección.

VI. HIPÓTESIS

La infección de *D. virginiana* con *G. turgidum* en un modelo experimental permitirá caracterizar las interacciones hospedero parásito y la inmunopatogenia de la gnathostomosis.

VII. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Evaluar la interacción parásito-hospedero durante una infección de *Didelphis virginiana* con *Gnathostoma turgidum* como modelo animal para el estudio de la inmunopatogénesis de la gnathostomosis

7.2. Objetivos específicos

7.2.1. Objetivo 1. Evaluar posibles hospederos intermediarios de *G. turgidum* durante una infección experimental *in vitro*

7.2.2. Objetivo 2. Tipificar los niveles de células leucocitarias de *D. virginiana* inmunosuprimidos y no inmunosuprimidos infectados con *G. turgidum* y estudiar su relación con la cura espontánea.

7.2.3. Objetivo 3. Estudiar el proceso histopatológico en hígado y estómago de *D. virginiana* inmunosuprimidos y no inmunosuprimidos durante una infección con *G. turgidum*.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Tipo de estudio

Es un estudio de tipo experimental, transversal, observacional, semicontrolado, cuyos datos en las distintas fases experimentales serán de tipo cuantitativo y cualitativo.

8.2. Diseño experimental

El estudio fue dividido en dos etapas:

La etapa 1 correspondió a la evaluación de microcrustáceos y anfibios como hospederos intermediarios de *G. turgidum*. Para ello se capturó un tlacuache en la zona endémica de *G. turgidum* en el sur de Sinaloa y se utilizó como fuente de huevos de *Gnathostoma*. Los huevos fueron puestos en incubación a temperaturas controladas para la obtención de larvas L2, las cuales fueron puestas en interacción con copépodos de la especie *M. edax*. Posterior a la interacción se determinó la capacidad de ingesta de larvas L2 de *G. turgidum* y la relación que existía entre el número de larvas parasitadas con la carga parasitaria. Los copépodos infectados se utilizaron para alimentar a anuros del género *Lithobates*, posterior a 15-20 días posterior a la interacción se realizaron necropsias a los anuros para buscar larvas L3A. El esquema de la etapa 1 puede ser observado en la figura 7.

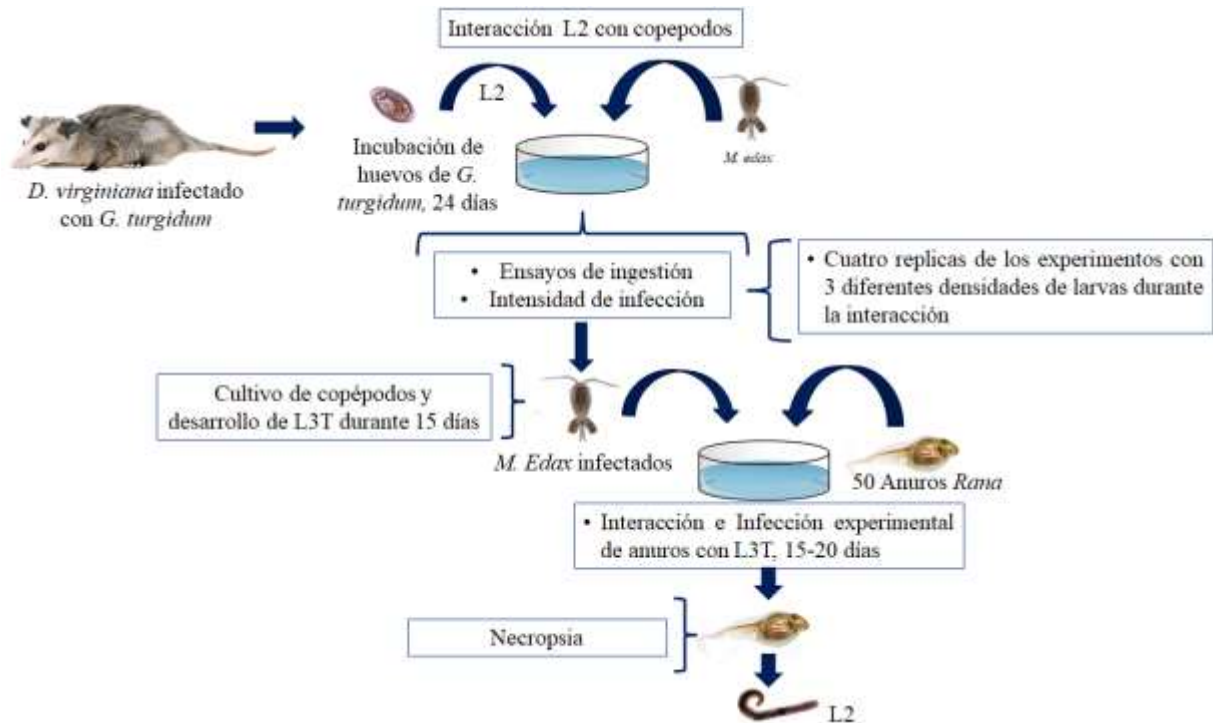


Figura 7. Etapa experimental 1. Se muestra el esquema general que fue utilizado para evaluar in vitro posibles hospederos intermediarios de *G. turgidum* mediante infecciones experimentales. Se capturó un tlacuache infectado con *G. turgidum* y a partir de las heces del tlacuache se aislaron huevos del parásito. Los huevos fueron incubados y se obtuvo la L1 que fue puesta en interacción con copepodos, durante la interacción se realizaron ensayos de ingestión e intensidad de infección. Posteriormente los copepodos infectados fueron utilizados para alimentar a anuros de *Rana*, después de 15-20 días de haber sido alimentados los anuros fueron sacrificados y se les practicó una necropsia para buscar L3T de *G. turgidum*.

La etapa 2 consistió en la captura de 8 tlacuaches *D. virginiana* infectados con *G. turgidum* que fueron organizados en 2 grupos de 4 tlacuaches. Uno de los grupos fue sometido a tratamiento de inmunosupresión. Posterior a 45 días de tratamiento de inmunosupresor, los animales de cada grupo fueron evaluados respecto a los cambios de los niveles de células leucocitarias en sangre periférica y respecto al daño histopatológico causado por el parásito en hígado y estómago. Fueron incluidos además 2 grupos control conformados por 4 tlacuaches por grupo, uno de ellos fue sometido a inmunosupresión y fueron evaluados los mismos parámetros que en los grupos infectados. El esquema de la etapa 2 se observa en la (Figura 8).

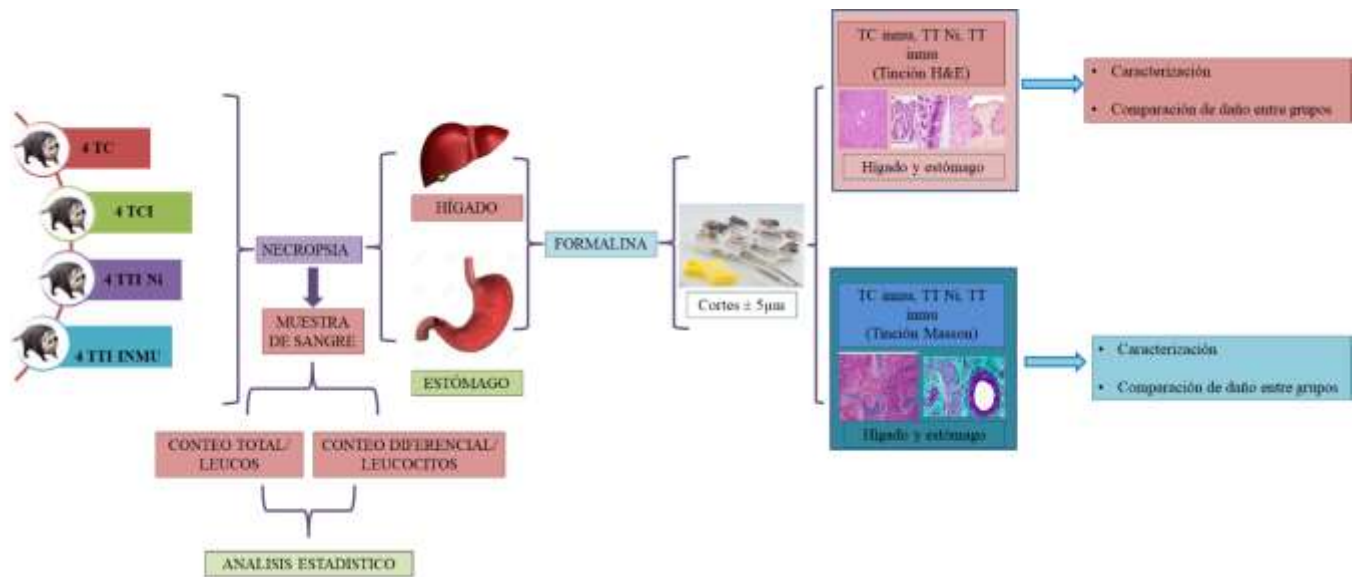


Figura 8. Etapa experimental 2. Se muestra el esquema general que será utilizado para tipificar los niveles de células leucocitarias y estudiar el proceso histopatológico en hígado y estómago de *D. virginiana* inmunosuprimidos y no inmunosuprimidos durante una infección con *G. turgidum*. Se formaron 4 grupos TC (grupo control), TCI (grupo control inmunosuprimido), TTI Ni, grupo infectado no inmunosuprimido y TTI IUNMU (grupo infectado inmunosuprimido). Posterior al periodo de tratamiento, los animales de todos los grupos fueron sacrificados, se obtuvieron muestras de sangre para realizar los conteos leucocitarios. Durante la necropsia se obtuvieron hígados y estómagos que fueron sometidos a procesamiento histopatológico e inclusión en parafina y posteriormente los cortes fueron teñidos con hematoxilina y eosina, así como tricrómica de Masson. Finalmente se realizó la caracterización histopatológica de los tejidos de cada uno de los grupos.

8.3. Etapa experimental 1

8.3.1. Captura y cultivo de copépodos

Los copépodos fueron capturados en la zona endémica en el Tanque Vía de la comunidad de Tecualilla, Escuinapa, Sinaloa, (22°45'27.97''N 105°40'25.41''W). La colecta del material biológico se realizó utilizando la técnica de filtrado de volumen conocido, se extrajeron 100 L de agua de manera aleatoria en diferentes puntos del estanque utilizando una cubeta de 19 L de capacidad. Con la ayuda de un filtro de PVC con luz de malla de 70 µm, se filtrará el volumen de agua recuperado, quedando los copépodos atrapados en la malla. Para el cultivo en el laboratorio, los copépodos capturados fueron colocados en un bidón de 20 L con oxigenación asistida y fueron trasladados al Laboratorio de Conservación de la Fauna Silvestre de la Facultad de Biología de la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS), para su posterior identificación y cultivo. Los copépodos fueron separados del resto de los organismos colectados en la muestra y fueron cultivados en frascos de 5 L, con agua de río (pH 7.0), manteniéndose con oxigenación asistida mediante aireadores comerciales para pecera. Para la alimentación de los copépodos se utilizó agua enriquecida con *Paramecium*.

8.3.2. Identificación morfológica de copépodos

Se realizó el análisis morfológico macroscópico de los copépodos utilizando un estereomicroscopio Motic SMZ-168®. Para el análisis microscópico, los especímenes fueron fijados en glicerina y observados en un microscopio invertido Motic AE21, y fotografiados con una cámara digital Motic10 plus. La identificación se realizó mediante claves dicotómicas, tomando en cuenta los criterios de Suárez-Morales, 2000, Reid y Moreno, 1999.

8.3.3. *Captura de anuros del género Rana*

Alrededor de 50 anuros del género *Rana* fueron recuperados de las inmediaciones de las riberas del Río Culiacán en la ciudad de Culiacán. Para ello se utilizaron una red de arrastre y contenedores de plástico 3L para su transporte al laboratorio de Conservación de la Fauna Silvestre, de la Facultad de Biología de la UAS, donde se mantuvieron a temperatura ambiente en peceras con oxigenación asistida y alimentados con alimento para peces hasta la infección *in vitro* como segundos hospederos.

8.3.4. *Desarrollo in vitro de L2 de G. turgidum*

Tlacuaches capturados en la zona endémica y coproparasitoscópicamente positivos a *G. turgidum* fueron empleados como la fuente de huevos del parásito. Cuatrocientos huevos fueron aislados mediante gradientes de sacarosa y cuantificados a través de un microscopio Motic AE21. Posteriormente se incubaron en cajas Petri con 30 ml de agua y 50µg/ml gentamicina durante 24-30 días (Janwan y col. 2011).

8.3.5. *Infección experimental de M. edax con larvas L2 de G. turgidum: evaluación de la capacidad de ingesta de copéodos sobre L2 y su asociación con la carga parasitaria*

La infección experimental de copéodos se llevó a cabo utilizando 240 larvas L2 de *G. turgidum* eclosionadas durante la incubación de huevos obtenidos de un tlacuache infectados con una carga parasitaria superior a los 10,000 huevos por gramo (HPG). Para infectar y evaluar la capacidad de ingesta de *M. edax* sobre larvas L2 de *G. turgidum* se utilizó la metodología empleada por Torres-Avenidaño y col. en 2017 con modificaciones. Se realizaron bioensayos donde se incubó a los copéodos hembra grávidas (con 24 horas previas de ayuno) con larvas L2 de *G. turgidum* en diferentes densidades, 1:5, 1:10, 1:15. Los bioensayos se

llevaron a cabo en cajas de 96 pozos y constaron de 4 réplicas y dos controles por cada densidad (en el caso de los controles sólo se mantuvieron las densidades de larvas sin presencia de copépodos). Cada bioensayo se realizó por duplicado. Después de 24 horas de interacción se procedió a realizar el conteo del número de larvas ingeridas. Las medias de ingestión por densidad fueron comparadas con una prueba de Tukey. También se evaluó si el número de larvas depredadas estaba en relación con el número de larvas infectantes incorporadas al celoma de los copépodos. Para ello se tomó en cuenta el número de larvas depredadas y el número de larvas que se encontraban infectando al copépodo 24 horas post-interacción. Las diferencias entre las cargas parasitarias de las diferentes densidades fueron analizadas con la prueba Kruskal-Wallis y la prueba Jonckheere-Terpstra (J-T) fue utilizada para determinar si la tendencia de la carga parasitaria incrementaba en relación al aumento de la densidad de larvas a las que se exponían los copépodos (Torres-Avenidaño y col. 2017). Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS versión 23.0, una $p < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa.

8.3.6. *Infección experimental de anuros del género Rana con L3T de G. turgidum*

Para evaluar a posibles segundos hospederos intermediarios de *G. turgidum*, 50 anuros del género *Rana* fueron alimentados con copépodos infectados con L3T. Los anuros fueron colocados de manera individual en 150 ml de agua desclorada en recipientes de 200 ml de capacidad y se alimentaron con copépodos infectados, ajustando el número de copépodos hasta completar una densidad de 10 larvas L3T por cada anuro. La interacción finalizó al día 5 post-infección, posteriormente los anuros sacrificados 15 días después y se les realizó una necropsia por compresión del tejido en placas de vidrio. Se realizó la búsqueda y conteo del número de larvas L3A infectantes por cada anuro (Mosqueda-Cabrera y col. 2009).

8.4. Etapa experimental 2

8.4.1. Captura de *Didelphis virginiana* y mantenimiento en condiciones de cautiverio

Para evaluar los cambios histopatológicos y de poblaciones leucocitarias causados por *G. turgidum* en hospederos definitivos, 8 tlacuaches fueron capturados con redes de golpeo en un área libre de *G. turgidum* ubicada en Navolato, Sinaloa con coordenadas 24°45'55''N, 107°42'7''W. Los animales fueron desparasitados con Drontal puppy® (Bayer/ KVP Pharma/ Alemania) en una dosis única que contiene 30 mg/kg de pamoato de pirantel y 28.8 mg/kg de febantel. Posteriormente fueron organizados en dos grupos de 4 tlacuaches cada uno y se les asignó la clave de identificación grupal TC (grupo control negativo) y TCI (grupo control negativo inmunosuprimido). Así mismo, se capturaron 8 tlacuaches infectados con *G. turgidum* en un área endémica de *Gnathostoma*. Con ellos se formaron dos grupos constituidos de 4 animales cada uno, a los que se les asignó la clave de identificación grupal TTI Ni (tlacuaches infectados no inmunosuprimidos) y TTI INMU (tlacuaches infectados inmunosuprimidos). Es necesario mencionar que en el caso del grupo TTI INMU se les realizó un muestreo preinmunosupresión y con las muestras se formó un grupo alternativo con clave de identificación TTI Pre-INMU (tlacuaches infectados preinmunosupresión). Todos los tlacuaches fueron mantenidos en cautiverio en jaulas de 100 x 100 cm y se alimentan con comida comercial para perros, agua *ad libitum*, a una temperatura controlada de entre 27-30 °C y con periodos de luz- oscuridad de 12 horas. Después de formados los grupos, dos de ellos TCI y TTI Pre-INMU (posterior a la inmunosupresión se le asignó la clave TTI INMU) fueron sometidos a un esquema de inmunosupresión por un periodo aproximado de un mes y medio. Transcurrido un periodo en cautiverio de aproximadamente 3 meses, los tlacuaches de todos

los grupos fueron sacrificados para llevar a cabo los estudios correspondientes con el planteamiento de la investigación.

8.4.2. *Inmunosupresión de D. virginiana*

Los tlacuaches pertenecientes a los grupos TCI y TTI INMU fueron tratados con Prednisona oral (PREMAGNOL®/ Allen laboratorios S. A. de C. V./ México). Se siguió el esquema de inmunosupresión propuesto por Abreu Morales & Fidalgo Álvarez, 2003 con modificaciones utilizando una dosis de inducción de 1 mg/kg dos veces al día por 15 días, seguido de una dosis de mantenimiento de 2.5 mg/kg durante 30.

8.4.3. *Evaluación del número total y conteo diferencial de leucocitos en sangre de D. virginiana infectados con G. turgidum*

8.4.3.1. *Conteo total de células leucocitarias en frotis sangre periférica de D. virginiana infectados con G. turgidum*

Se determinó el número total de leucocitos en sangre de cada uno de los grupos de tlacuaches TC, TCI, TTI Ni, TTI Pre-INMU y TTI INMU. Para realizar el conteo total se tomó una muestra de 2 ml de sangre por punción cardiaca durante los procedimientos de eutanasia, la sangre fue colocada en tubos con anticoagulante EDTA K2 (BD Vacutainer®) y se tomó una submuestra para realizar extendidos sanguíneos sobre porta objetos. Se realizaron dos extendidos por tlacuache de cada grupo. Las laminillas fueron secadas al aire y teñidas con un kit hemocolorante rápido HYCEL® (HYCEL de México S. A. de C. V./ México), el conteo de leucocitos se realizó en un microscopio IROSCOPE® MG- μ 100C (Microscopios S. A. de C. V./ México) utilizando el objetivo de 40X. Se contó el número de células leucocitarias en 10 campos de las laminillas 2 realizadas para cada uno de los tlacuaches de los distintos

grupos y posteriormente se determinó el promedio de células por tlacuache. El valor total se obtuvo aplicando la fórmula Total de leucocitos en 10 campos X 2,000 (Walberg, 2001).

8.4.3.2. *Conteo diferencial de leucocitos en sangre periférica de D. virginiana infectados con G. turgidum*

Con el objetivo de comparar los cambios en las densidades de las estirpes leucocitarias entre los grupos TC, TCI, TTI Ni, TTI Pre-INMU y TTI INMU, se tomó como base las laminillas con frotis de sangre periféricas de los tlacuaches de cada uno de los grupos y se determinó el porcentaje de Neutrófilos, Linfocitos, Monocitos, Basófilos y Eosinófilos.

8.4.3.3. *Análisis estadístico*

Para estimar las diferencias del número total leucocitario se realizaron pruebas de normalidad de los datos y se compararon entre grupos utilizando pruebas para datos paramétricos con ANOVA de un factor con prueba pos-hoc de Tukey, tomando un valor de significancia de $p < 0.05$. Respecto a los resultados del conteo diferencial de leucocitos, los porcentajes obtenidos fueron promediados por grupo y se sometieron a pruebas de normalidad. Se realizó una comparación de medias entre grupos con ANOVA de un factor y prueba pos-hoc de Tukey. Una $p < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa, todos los análisis estadísticos fueron elaborados en el software SPSS versión 23.0.

8.5. **Etapa experimental 2**

8.5.1. *Evaluación del daño histopatológico de hígado y estómago causado por G. turgidum en D. virginiana*

Todos los animales de los grupos TC, TCI, TTI Ni y TTI INMU fueron sometidos a eutanasia. El procedimiento se realizó sedando a los especímenes con una dosis intramuscular de 10 mg/kg de tiletamina-zolazepam (Zoletil50®, Virac/ Jalisco/ México), posteriormente se

procedió a tomar una muestra de sangre por punción cardiaca que fue utilizada para el conteo leucocitario. El sacrificio se realizó utilizando una inyección intracardiaca de 5 ml de Kaliolite® (MERK S. A. de C. V./México) (cloruro de potasio 1.49 g/5ml). Posterior al sacrificio se realizó una necropsia y en el caso de los grupos TTI Ni y TTI INMU se buscó la presencia de parásitos en hígado y estómago. Los órganos de los tlacuaches fueron recuperados durante las necropsias fijados en formalina al 10 % en PBS para su posterior procesamiento histológico.

8.5.1.1. Procesamiento histológico de hígado y estómago de D. virginiana

La preparación de las muestras tanto de hígado como estómago, recuperadas y fijadas previamente en formalina al 10 % en PBS para ser utilizadas en la evaluación de daño histopatológico se realizó de acuerdo con las instrucciones del Manual de Métodos Histotecnológicos del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América. El tejido de hígado y estómago fueron cortados en trozos de 0.5 cm de ancho por 1 cm de largo, cada uno de los cortes se colocó en cassettes de fijación para parafina. Posteriormente se sometieron a un proceso de deshidratación/aclaramiento, después fueron montados en capsulas de inclusión y se les añadió parafina en estado líquido a 60 °C. Las capsulas con muestras se colocaron en una superficie fría a 4°C para solidificar la parafina. Las muestras incluidas en parafina se cortaron a un grosor de 4 µm en un micrótopo rotatorio Leica RM2521RT (Leica Mycrosistems/Alemania). Una vez terminado el corte de la muestra se colocaron en una tina de flotación con agua destilada por 5 minutos, los cortes se colectaron utilizando una porta objeto y se llevaron a una incubadora a 70 °C para eliminar el exceso de parafina (Torres-Montoya y col. 2017; Edna y col. 1992).

8.5.1.2. *Tinción con hematoxilina y eosina*

Para realizar la tinción de hematoxilina y eosina de Mayer el portaobjeto con la muestra se desparafinó sumergiendo las laminillas con cortes en baños de Xileno y se hidrató con baños en alcohol absoluto, alcohol al 95% y agua destilada. Se tiñó en solución de hematoxilina de Mayer (50 g Alumbre de Potasio [Sigma], 50 g hidrato de cloral [Sigma], 1000 mL agua destilada) por 5 minutos. Se lavó con agua corriente tibia por un minuto, después se lavó con agua destilada y se colocó en HCL al 1% en etanol al 70%, se lavó con agua corriente, y se le dio un baño en hidróxido de sodio al 1%. Se lavó con agua corriente y se contrastó con solución de eosina-floxina (100 mL de solución de eosina: 1 g de eosina hidrosoluble [Sigma], 100 mL de agua destilada; 10 mL de solución floxina: 1 g de floxina B [J. T. Barker], 100 mL agua destilada; 780 mL etanol al 95% [Fluka], 4 mL ácido acético glacial [Baker]) por 2 minutos. Después del contraste se deshidrató y aclaró a través de dos cambios de 2 minutos cada uno de etanol al 95%, etanol absoluto [Baker] y Xileno [Baker], finalmente se montó en medio resinoso y se observó en un microscopio óptico IROSCOPE® MG-μ100C (Microscopios S. A. de C. V./ México) (Torres-Montoya y col. 2017).

8.5.1.3. *Tinción tricrómica de Masson*

Las muestras se desparafinaron y se hidrataron hasta llegar a agua destilada, se trataron con solución de Bouin (50 mL ácido acético glacial [Baker], 250 mL formaldehído 37% [Sigma], 750 mL ácido pícrico [Baker]) por 15 minutos. Posteriormente se lavaron con agua corriente y se enjuagarán con agua destilada. Se coloreó con solución de hematoxilina de hierro de Weigert's (100 mL solución matriz A: 1 g hematoxilina [Sigma], 100 mL etanol 95% [Fluka]; 100 mL solución matriz B: 4 mL cloruro férrico 29% [Sigma], 1 mL ácido clorhídrico 1M [Baker]) 7 minutos. Se volvieron a lavar con agua corriente y se enjuagaron

con agua destilada. Se coloreó con solución de fuscina ácida-escarlata de Biebrich (90 mL escarlata de biebrich 1% [Sigma], 10 mL fuscina ácida [Sigma], 1 mL ácido acético glacial [Baker]) por 8 minutos y después se enjuagaron con agua destilada. Se diferenció con solución de ácido fosfotungstico-fosfomolibdico (5 mL ácido fosfomolibdico [Sigma], 5 mL ácido fosfotungstico [Sigma], 200 mL agua destilada) por 4 minutos y se contrastó con azul de anilina (2.5 g azul anilina [Sigma], 2 mL ácido acético glacial [Baker], 200 mL agua destilada) por 5 minutos. Posteriormente se enjuagó con agua destilada, se deshidrató y aclaró con etanol al 95% (Fluka), alcohol absoluto (Fluka) y Xileno (J.T. Baker) por 2 minutos en cada solución repitiendo 1 ves. Finalmente se montaron los cortes con medio resinoso y se observaron los cortes teñidos en un microscopio IROSCOPE® MG- μ 100C (Microscopios S. A. de C. V./ México) (Torres-Montoya y col. 2017).

IX. RESULTADOS

9.1. Identificación morfológica de *M. edax*

Dentro de los copépodos evaluados preliminarmente como posibles hospederos intermediarios, Se identificaron 3 especies, *Leptodiptomus siciloides*, *Arctodiptomus dorsalis*; sin embargo, sólo la especie identificada como *M. edax* fue susceptible a la infección con larvas L2 por lo que fue utilizado para la evaluación de los ensayos de depredación y desarrollo de larvas L3T de *G. turgidum*. Las características morfológicas de *M. edax* (Figura 9A) fueron: Anténula con 17 segmentos (Figura 9B), quinta pata bisegmentada con dos largas setas en el segmento distal (Figura 9C), ramas caudales plumosas (Figura 9D), membrana hialina del segmento 17 de la anténula fuertemente serrada (Figura 9E).

9.2. Desarrollo *in vitro* de L2 de *G. turgidum*

Se observó el desarrollo de larvas L1 a partir del día 8 de incubación y la eclosión de las larvas L2 ocurrió entre los días 22-24 (Figura 10A-E). Al momento de la eclosión las larvas poseen una vaina membranosa transparente que cubre su cuerpo (Figura 10F), bulbo cefálico inexistente, así como el desarrollo de los sacos cervicales y diferenciación de esófago e intestino. Posterior a la eclosión las larvas mostraron movimientos enérgicos de desplazamiento serpenteantes con dirección errática en el medio acuoso.

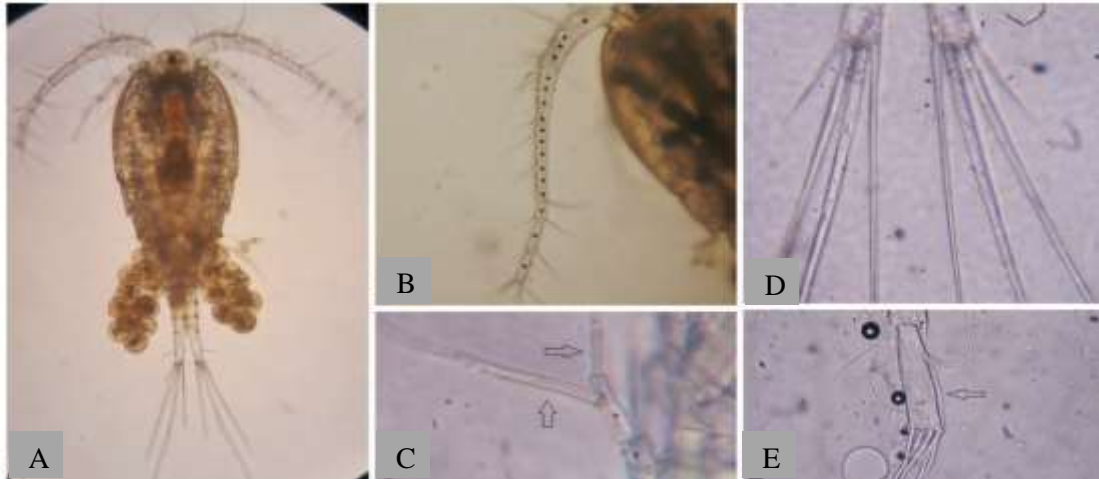


Figura 9. Identificación morfológica

ca de *M. edax*. A) vista dorsal de *M. edax*, B) anténula con 17 segmentos, C) quinta pata bisegmentada con dos largas setas en el segmento distal, D) ramas caudales plumosas, E) membrana hialina del segmento 17 de la anténula fuertemente serrada.

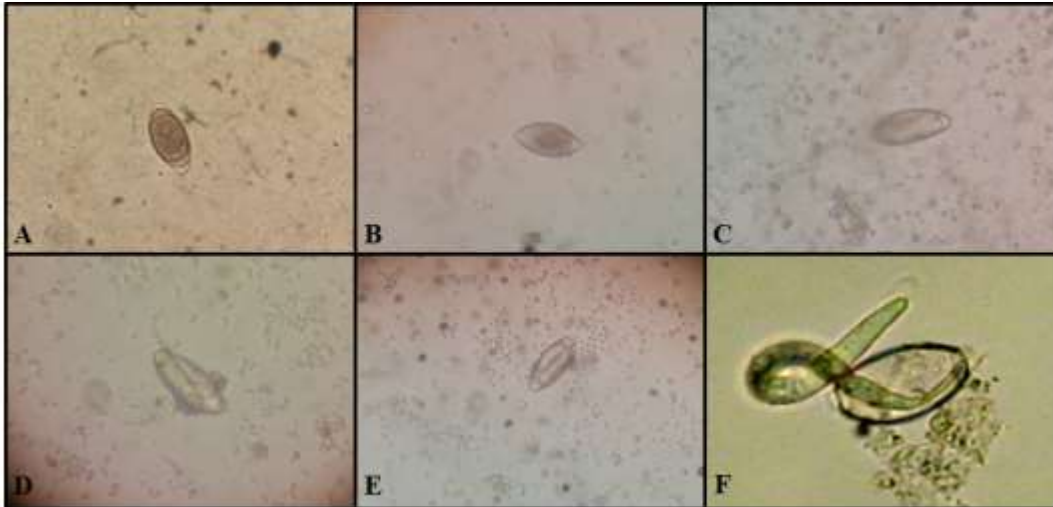


Figura 10. Desarrollo in vitro de larvas L2 de *G. turgidum*. A) huevo de *G. turgidum*, B) huevo embrionado (4 de incubación), C) larva L1 (día 8 de incubación), D) larva L1 (día 15 de incubación), E) larva L1 (día 18-20 de incubación), F) eclosión de L2 (día 22-24 de incubación).

9.4. Capacidad de ingesta de *M. edax* sobre larvas de *G. turgidum*

Se observó que después de 24 horas de interacción entre los copépodos y larvas L2 el promedio de depredación en la densidad 1:5 fue de 3.5 ± 0.327 , en el bioensayo con densidad 1:10 fue de 7.5 ± 0.681 ; mientras que para la densidad 1:10 el promedio fue de 10.88 ± 1.025 . Al comparar las medias de depredación, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre las densidades expuestas ($p < 0.05$). Por otra parte, no se observó diferencia estadística entre la densidad de larvas infectantes en cada una de las densidades ($p = 0.849$); así mismo, el número de larvas con las que el copépodo se infecta se comportó con una tendencia similar indistintamente de la densidad de larvas a la que los copépodos se exponían ($J-T = 98.500$, $z = 0.142$, $p = 0.887$) (Figura 11).

9.5. Infección experimental de anuros del género *Rana* L3T de *G. turgidum*

De los 50 anuros interaccionados con copépodos infectados con larvas de *G. turgidum* solo se pudo observar un quiste con una aparente larva L3A con desarrollo incompleto en el tejido muscular de la región dorsal de un anuro (Figura 12). El tejido con el quiste se ofreció de alimento a un tlacuache *D. virginiana* capturado en un área no endémica de *Gnathostoma*. Después de un periodo de tres meses no se observó la presencia de larva L3A, gusano en estadio juvenil o daño aparente en ninguno de los órganos del marsupial.

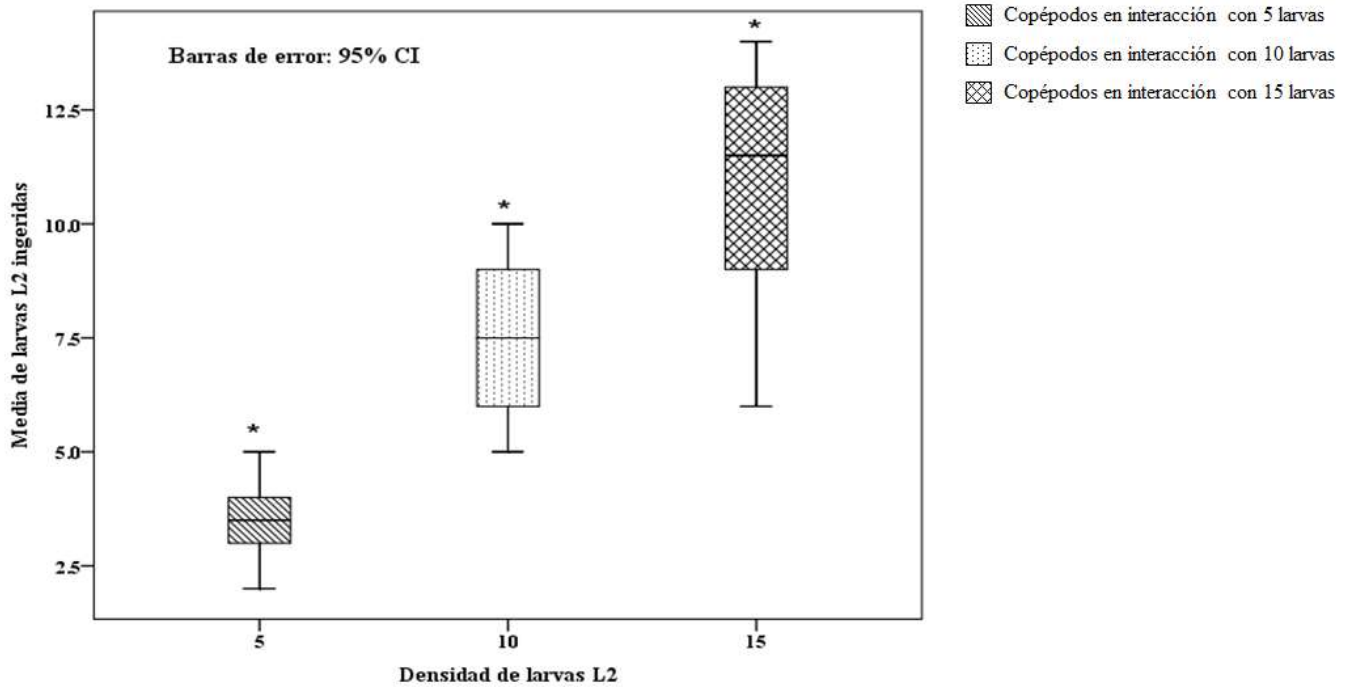


Figura 11. Capacidad de ingesta de *M. edax* expuesto a diferentes densidades de larvas L2 de *G. turgidum*. Gráfica que muestra la eficiencia depredativa de copéodos sobre larvas L2, (*) diferencia estadística entre medias de depredación. Los bigotes de las cajas representan los errores estándar de la media, (Tukey: $p < 0.05$).



Figura 12. Tejido muscular de anuro del género *Rana*. Posible quiste localizado en la musculatura dorsal del anuro. Se observa a una amplificación de 4X una estructura semicircular con aparente larva L3A de *G. turgidum* (flecha).

9.7. Evaluación del daño histopatológico y cambio del volumen de las estirpes leucocitarias de *D. virginiana* infectados con *G. turgidum*

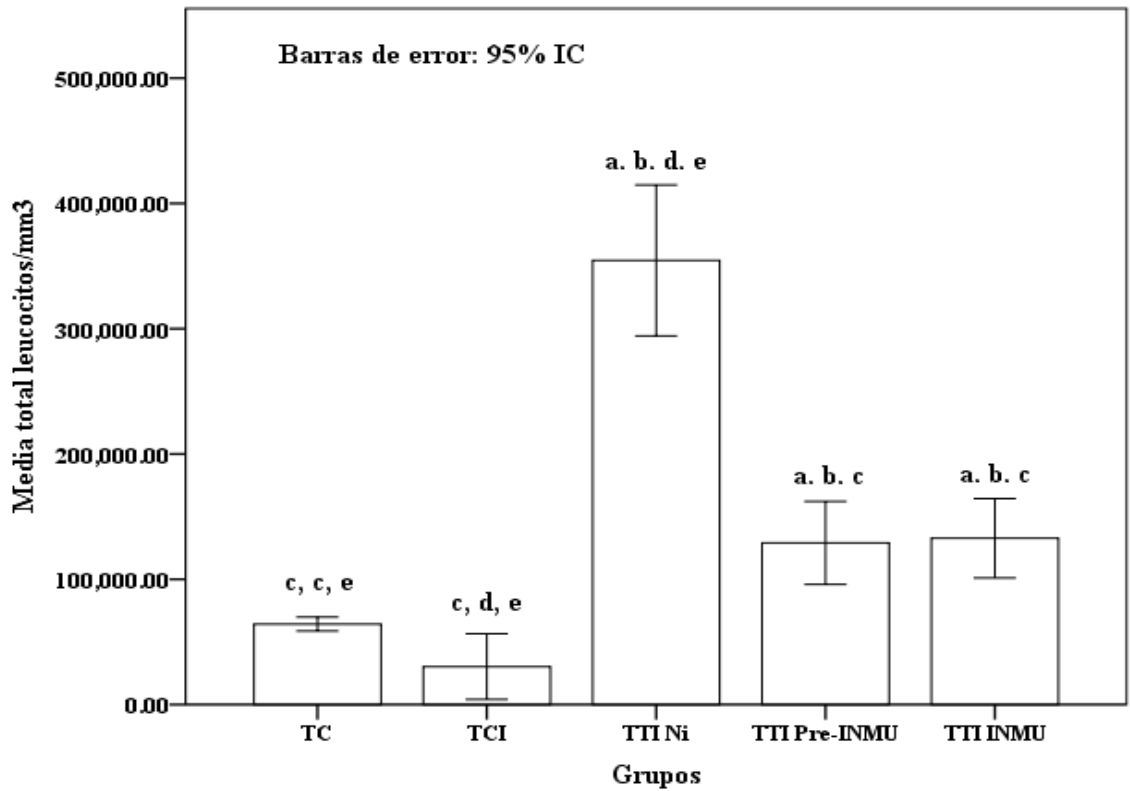
*9.7.1. Conteo total de leucocitos en sangre periférica de *D. virginiana* con y sin tratamiento inmunosupresor infectados con *G. turgidum**

Un total de 16 tlacuaches fueron evaluados durante este estudio agrupados en 4 grupos, TC, TCI, TTI Ni y TTI INMU, además de un grupo temporal que corresponde a la evaluación de los parámetros leucocitarios del grupo TTI INMU antes de la inmunosupresión (TTI Pre-INMU). El resumen de los datos de cada tlacuache se muestra en el cuadro 2.

El promedio de leucocitos totales para cada uno de los grupos fue de $64,250 \pm 1,750$ leucocitos/mm³ en el caso del grupo TC, que fue estadísticamente diferente con los grupos TTI Ni, TTI Pre-INMU y TTI INMU ($p < 0.05$), mientras comparado al grupo TCI se observaron valores sin diferencia estadística. Por su parte el grupo TCI tuvo una media de $30,250 \pm 8,229$ leucocitos/mm³. Al realizar el análisis estadístico fue diferente de los grupos TTI Ni, TTI Pre-INMU y TTI INMU ($p < 0.05$). Respecto a los grupos infectados el promedio fue de $354,500 \pm 18,945$ leucocitos/mm³ en el grupo TTI Ni que fue diferente al compararse con los valores de las medias del resto de grupos incluidos en este estudio ($p < 0.05$), así mismo, el grupo TTI Pre-INMU con una media de $129,000 \pm 10,400$ fue diferente de todos los grupos ($p < 0.05$) a excepción del grupo TTI INMU que con un valor medio de $132,750 \pm 9,961$ leucocitos/mm³ fue diferente de los grupos TC, TCI y TTI Ni ($p < 0.05$) (Figura 13).

Cuadro 2. Resumen del conteo diferencial y total de células leucocitarias en sangre periférica de *D. virginiana* infectados con *G. turgidum* y controles.

GRUPO	No. TLACUACHE	CONTEO TOTAL LEUCOCITARIO		ERROR ESTÁNDAR
		Conteo	Total individual/ mm ³	
CONTROL NO INMUNO	TC 1	30	60,000	63,500 1,750
	TC 2	34	68,000	
	TC 3	33	66,000	
	TC 4	30	60,000	
CONTROL INMUNO	TCI 1	24	52,000	33,500 8,229
	TCI 2	7	14,000	
	TCI 3	13	26,000	
	TCI 4	21	42,000	
INFECTADO NO INMUNO	TTI Ni 1	199	398,000	340,000 18,945
	TTI Ni 2	153	306,000	
	TTI Ni 3	167	334,000	
	TTI Ni 4	161	322,000	
INFECTADO PRE-INMUNO	TT PRE-INMU 1	78	156,000	128,000 10,400
	TT PRE-INMU 2	53	106,000	
	TT PRE-INMU 3	65	130,000	
	TT PRE INMU 4	60	120,000	
INFECTADO INMUNO	TT INMU 1	72	144,000	132,500 9,961
	TT INMU 3	57	114,000	
	TT INMU 3	77	154,000	
	TT INMU 4	59	118,000	



- a:** diferencia estadística con TC
- b:** diferencia estadística con TCI
- c:** diferencia estadística con TTI Ni
- d:** diferencia estadística con TTI Pre-INMU
- e:** diferencia estadística con TTI INMU

Figura 13. Conteo total de leucocitos en sangre periférica de *D. virginiana* sometidos a tratamiento de inmunosupresión e infectados con *G. turgidum*.

Se presenta la comparación del conteo de leucocitos entre grupos TC, TCI, TTI Ni, TTI Pre-INMU y TTI INMU (número de animales para cada grupo= 4). Las barras representan la media de cada grupo y las barras el error estándar. Las letras sobre las barras señalan diferencia estadística entre grupos. Valor de significancia para prueba de Tukey, $p < 0.05$.

9.7.2. *Conteo diferencial de neutrófilos en sangre periférica de D. virginiana con y sin tratamiento inmunosupresor e infectados con G. turgidum*

En el conteo diferencial de neutrófilos en los diferentes grupos de tlacuaches incluidos en este estudio, se observó que el grupo TC tuvo una media de 34.25 ± 1.75 neutrófilos por cada 100 células leucocitarias y fue estadísticamente diferente al ser comparado con los grupos TTI Ni (Tukey= 0.000) y TTI Pre-INMU (Tukey= 0.000). La comparación entre TC y el grupo TTI INMU no mostró diferencia estadística y la diferencia entre las medias de los grupos fue de 0.5 neutrófilos por cada 100 células leucocitarias (Figura 12). En cuanto al grupo TCI se obtuvo una media con valor de 28.25 ± 2.5 neutrófilos por cada 100 células leucocitarias. Se observó diferencia estadística al ser comparados con los grupos TTI Ni (Tukey= 0.000) y TTI Pre-INMU (Tukey= 0.000). En contraste mantuvo valores similares de neutrófilos con diferencias estadísticamente no significativas al ser contrastado con los grupos TCI (diferencia de medias= -6 neutrófilos) y TTI INMU (diferencia de medias= -5.5 neutrófilos (Figura 14).

Respecto al grupo TTI Ni (que no recibió tratamiento inmunosupresor) tuvo una media de 68 ± 4.02 neutrófilos por cada 100 células leucocitarias. Fue diferente estadísticamente con todos los grupos (Tukey=0.000) a excepción del grupo TTI- Pre-INMU (Tukey= 0.584) con quien mantuvo valores promedio de neutrófilos similares (diferencia de medias= 5 neutrófilos) (Figura 12). Los tlacuaches del grupo TTI Pre-INMU (que no había recibido tratamiento inmunosupresor) tuvieron una media de 63 ± 1.47 neutrófilos y al ser comparados con los demás grupos mostro un comportamiento similar al grupo TTI Ni, con diferencia estadística respecto a los grupos TC, TCI, TTI INMU (Tukey= 0.000), mientras que no se observó diferencia estadística entre grupos TTI Pre-INMU y TTI Ni (Tukey= 0.584) (Figura 14).

Al realizar el análisis estadístico de los valores de neutrófilos en tlacuaches del grupo TTI INMU (que habían recibido tratamiento inmunosupresor) se obtuvo una media de 33.75 ± 0.62 neutrófilos por cada 100 células leucocitarias y no se observó diferencia estadística al ser comparado con los grupos TC (Tukey= 1.000) y TCI (Tukey= 0.498), aunque fue estadísticamente diferente al ser comparado con los grupos de tlacuaches infectados que no recibieron tratamiento inmunosupresor, TTI Ni y TTI Pre-INMU (Tukey= 0.000) (Figura 14).

*9.7.3. Conteo diferencial de linfocitos en sangre periférica de *D. virginiana* con y sin tratamiento inmunosupresor e infectados con *G. turgidum**

En el conteo diferencial de linfocitos se obtuvieron medias por cada 100 células leucocitarias de 44.75 ± 1.10 para el grupo TC, 57.75 ± 2.78 en el grupo TCI, 7 ± 1.41 del grupo TTI Ni, 8.25 ± 0.25 para el grupo TTI Pre-INMU y una media de 59.72 ± 0.47 para el grupo TTI INMU. Al realizar la comparación de medias entre grupos, se observó diferencia estadística; el grupo TC fue diferente con todos los grupos (Tukey= 0.000), el grupo TCI fue diferente de los grupos TC, TTI Ni y TTI Pre-INMU (Tukey= 0.000), mientras que al ser contrastado con TTI INMU se observaron medias estadísticamente similares (0.952).

Respecto al grupo TTI Ni fue diferente de los grupos TC, TCI, TTI INMU (Tukey= 0.000) y fue similar al comparar las medias de linfocitos con el grupo TTI Pre-INMU (Tukey= 0.975). En cuanto al grupo TTI Pre-INMU mostró ser estadísticamente diferente de TC, TCI y TTI INMU (Tukey= 0.000), mientras que fue similar al grupo TTI NI (Tukey= 0.975). Se determinó que los tlacuaches TTI INMU tuvo un comportamiento similar a TCI (Tukey= 0.952) al ser ambos grupos sometidos a un tratamiento inmunosupresor, en contraste fue diferente del resto de los grupos (Tukey= 0.000) (Figura 15).

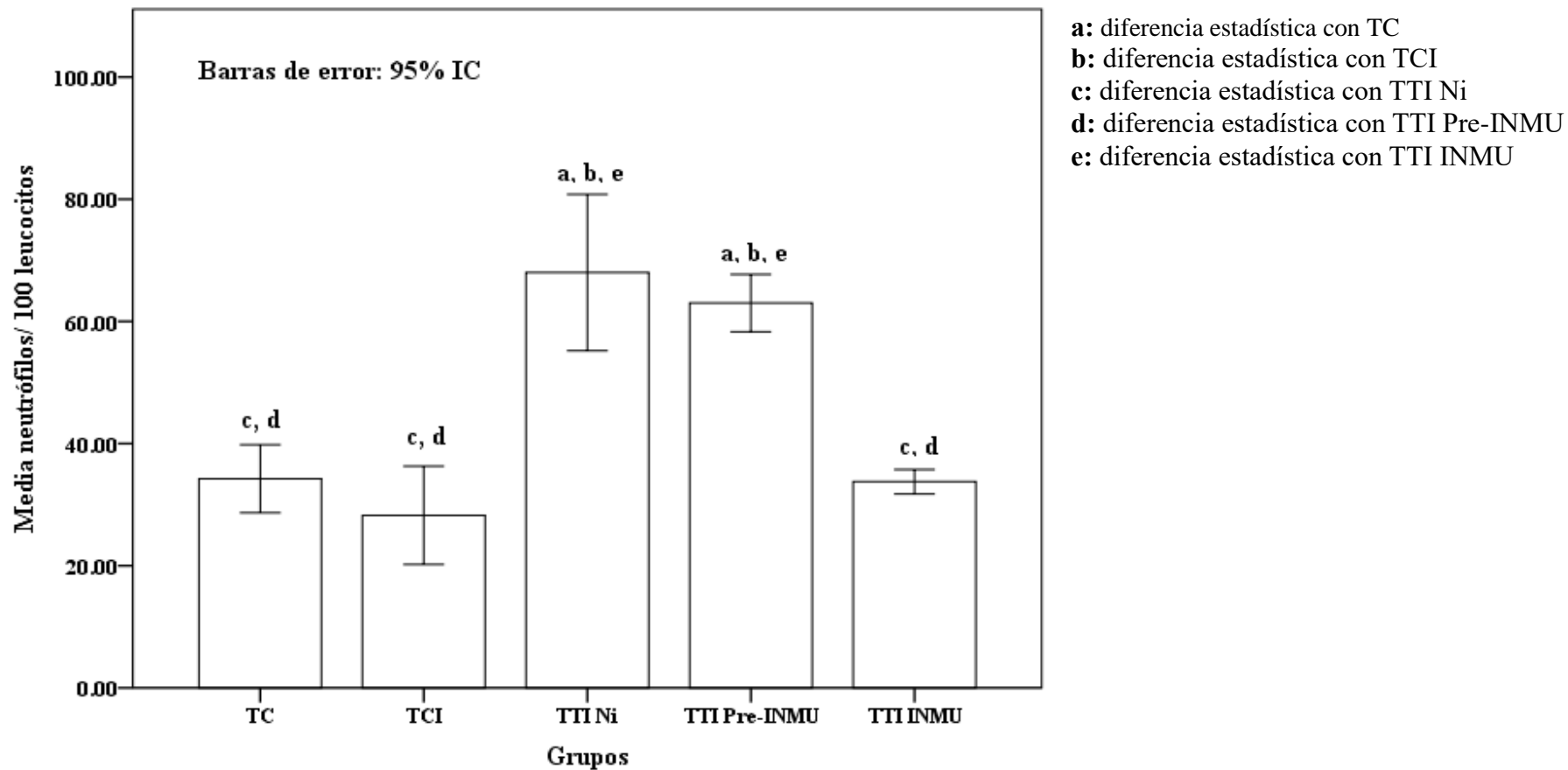
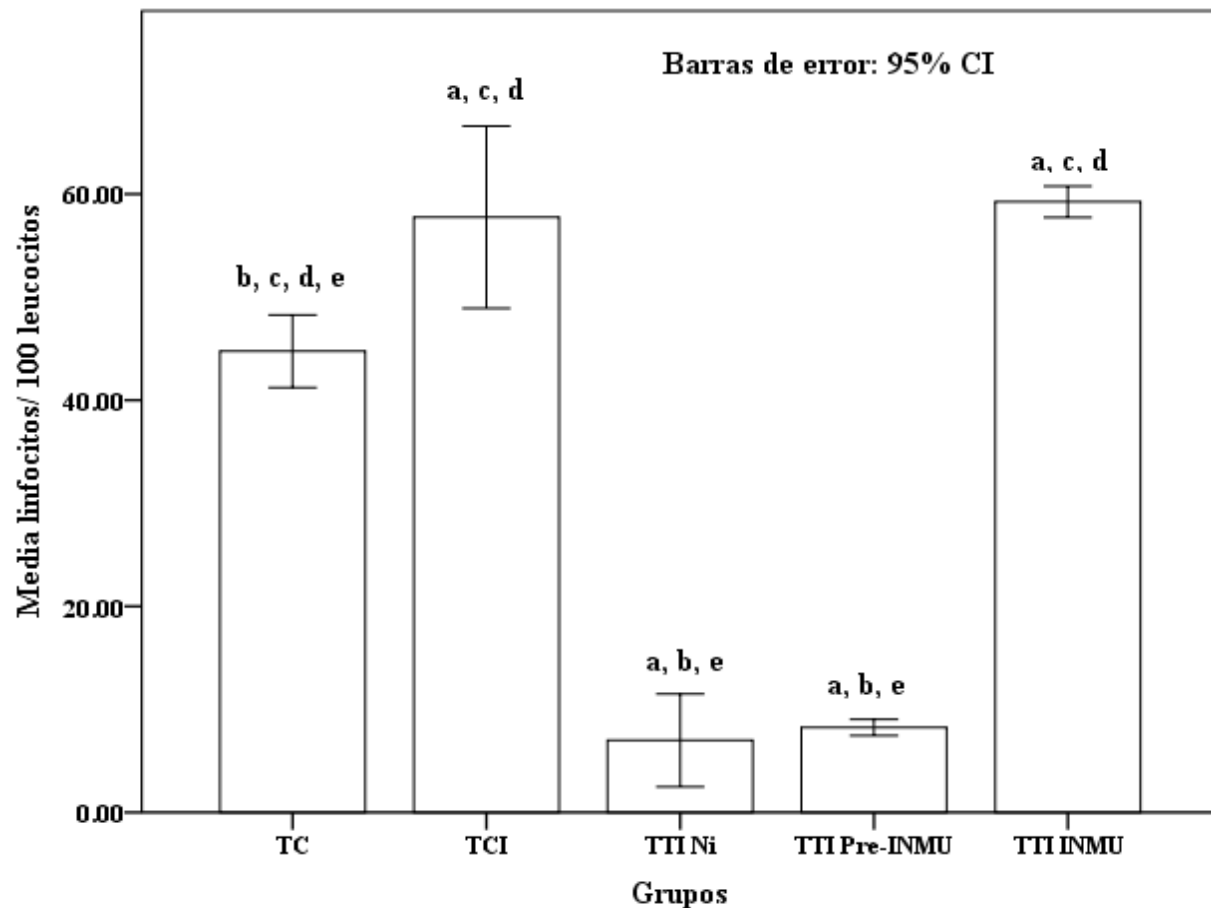


Figura 14. Conteo diferencial de neutrófilos en sangre periférica de *D. virginiana* sometidos a tratamiento de inmunosupresión e infectados con *G. turgidum*. Se presenta la comparación del conteo diferencial de neutrófilos entre grupos TC, TCI, TTI Ni, TTI Pre-INMU y TTI INMU (número de animales para cada grupo= 4). Las barras representan la media de cada grupo y las barras el error estándar. Las letras sobre las barras señalan diferencia estadística entre grupos. Valor de significancia para prueba de Tukey, $p < 0.05$.



a: diferencia estadística con TC
b: diferencia estadística con TCI
c: diferencia estadística con TTI Ni
d: diferencia estadística con TTI Pre-INMU
e: diferencia estadística con TTI INMU

Figura 15. Conteo diferencial de linfocitos en sangre periférica de *D. virginiana* sometidos a tratamiento de inmunosupresión e infectados con *G. turgidum*.

Se presenta la comparación del conteo diferencial de linfocitos entre grupos TC, TCI, TTI Ni, TTI Pre-INMU y TTI INMU (número de animales para cada grupo= 4). Las barras representan la media de cada grupo y las barras el error estándar. Las letras sobre las barras señalan diferencia estadística entre grupos. Valor de significancia para prueba de Tukey, $p < 0.05$.

9.7.4. Conteo diferencial de monocitos en sangre periférica de D. virginiana con y sin tratamiento inmunosupresor e infectados con G. turgidum

El conteo diferencial de monocitos obtuvo medias de 3.2 ± 0.47 en el grupo TC, 1.24 ± 0.47 en TCI, 0.75 ± 0.47 en TTI Ni, 9.16 ± 0.94 para TTI Pre-INMU y 1.5 ± 0.50 en el grupo TTI INMU. Al realizar la comparación de medias, los grupos TC, TCI, TTI Ni y TTI INMU fueron estadísticamente diferentes del grupo TTI Pre-INMU (Tukey= 0.000). En contraste los grupos TC, TCI, TTI Ni y TTI INMU se mantuvieron estadísticamente similares con valores de significancia entre 0.068 y 0.998 de acuerdo con el estadístico de Tukey (Figura 16).

9.7.5. Conteo diferencial de basófilos en sangre periférica de D. virginiana con y sin tratamiento inmunosupresor e infectados con G. turgidum

El conteo diferencial de basófilos por cada 100 células leucocitarias mostró valores medios de 4.5 ± 0.86 en los tlacuaches del grupo TC, 2 ± 0.40 en el grupo TCI, 8.25 ± 2.39 correspondiente al grupo TTI Ni, 8 ± 0.57 para el grupo TTI Pre-INMU. Respecto al grupo de tlacuaches infectados inmunosuprimidos TTI INMU mantuvieron valores de 0 monocitos. La comparación de medias reveló diferencia estadística entre el grupo TCI contrastado con los grupos TTI Ni (Tukey= 0.014) y TTI Pre-INMU (Tukey= 0.019). El grupo TTI Ni fue diferente de los grupos TCI (Tukey=0.014) y TTI INMU (Tukey=0.001). Así mismo, los tlacuaches TTI Pre-INMU fueron diferentes a los grupos TCI (Tukey=0.019) y TTI Ni (Tukey= 0.002). Por otra parte, se observó el efecto inmunosupresor de acuerdo con las diferencias estadísticas obtenidas entre el grupo TTI INMU comparados con los grupos TTI Ni (Tukey= 0.001) y TTI Pre-INMU (Tukey= 0.002), mientras que se mantuvo con valores similares a los grupos TC (Tukey= 0.102) y TCI (Tukey= 0.753) (Figura 17).

9.7.5. Conteo diferencial de basófilos en sangre periférica de D. virginiana con y sin tratamiento inmunosupresor e infectados con G. turgidum

El conteo diferencial de basófilos por cada 100 células leucocitarias mostró valores medios de 4.5 ± 0.86 en los tlacuaches del grupo TC, 2 ± 0.40 en el grupo TCI, 8.25 ± 2.39 correspondiente al grupo TTI Ni, 8 ± 0.57 para el grupo TTI Pre-INMU. Respecto al grupo de tlacuaches infectados inmunosuprimidos TTI INMU mantuvieron valores de 0 monocitos. La comparación de medias reveló diferencia estadística entre el grupo TCI contrastado con los grupos TTI Ni (Tukey= 0.014) y TTI Pre-INMU (Tukey= 0.019). El grupo TTI Ni fue diferente de los grupos TCI (Tukey=0.014) y TTI INMU (Tukey=0.001). Así mismo, los tlacuaches TTI Pre-INMU fueron diferentes a los grupos TCI (Tukey=0.019) y TTI Ni (Tukey= 0.002). Por otra parte, se observó el efecto inmunosupresor de acuerdo con las diferencias estadísticas obtenidas entre el grupo TTI INMU comparados con los grupos TTI Ni (Tukey= 0.001) y TTI Pre-INMU (Tukey= 0.002), mientras que se mantuvo con valores similares a los grupos TC (Tukey= 0.102) y TCI (Tukey= 0.753) (Figura 17).

9.7.6. Conteo diferencial de eosinófilos en sangre periférica de D. virginiana con y sin tratamiento inmunosupresor e infectados con G. turgidum

Respecto al conteo diferencial de eosinófilos en los grupos de tlacuaches de este estudio, se observaron medias de 10 ± 0.57 en el grupo TC, 10.50 ± 0.86 en los animales TCI, 14 ± 1.95 en el caso de TTI Ni, 11.50 ± 1.19 para el grupo TTI Pre-INMU y 6 ± 0.40 en el grupo TTI INMU. La comparación de medias mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos TTI Ni y TTI INMU (Tukey= 0.001), así mismo, se observó diferencia entre los grupos TTI Pre-INMU y TTI INMU (Tukey= 0.027) (Figura 18).

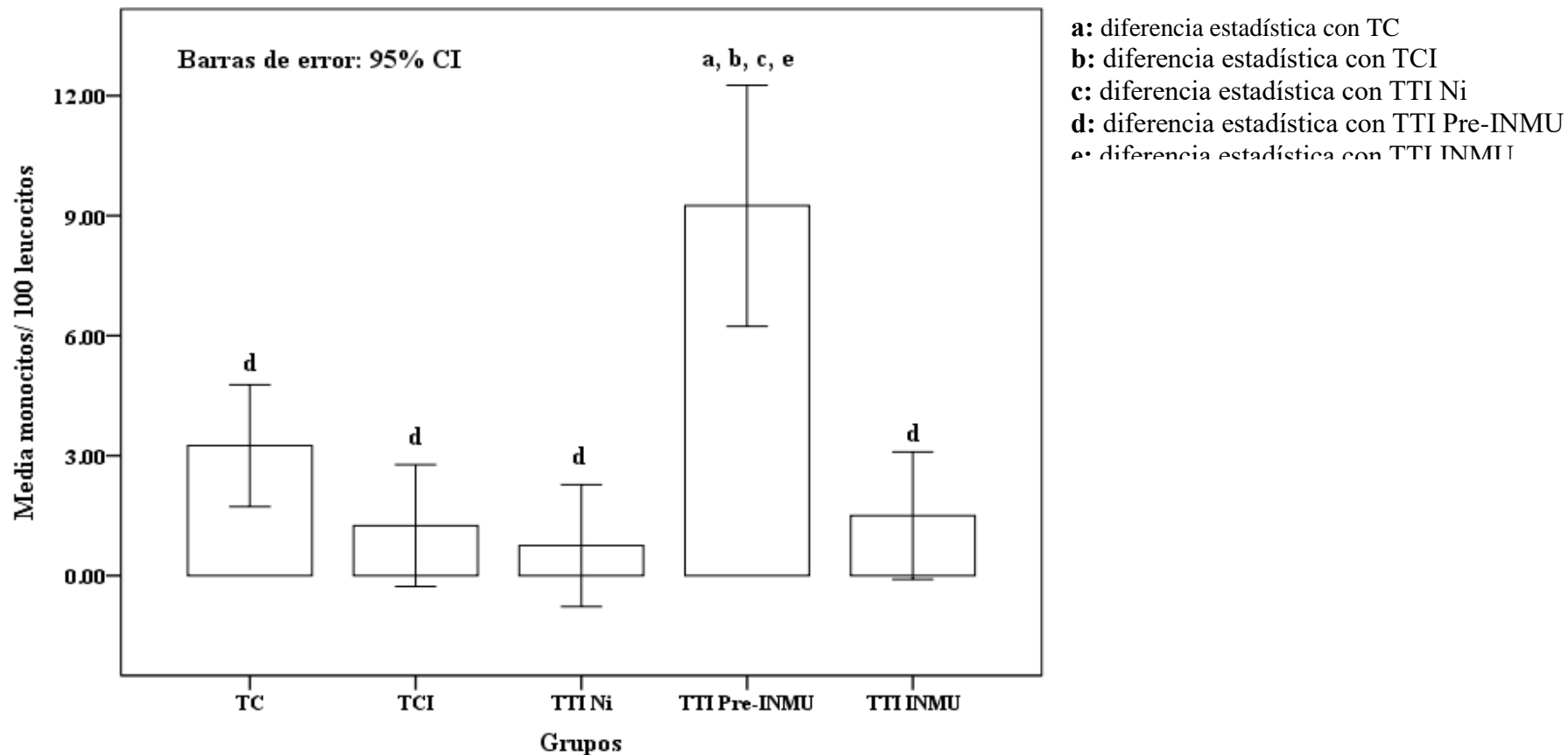
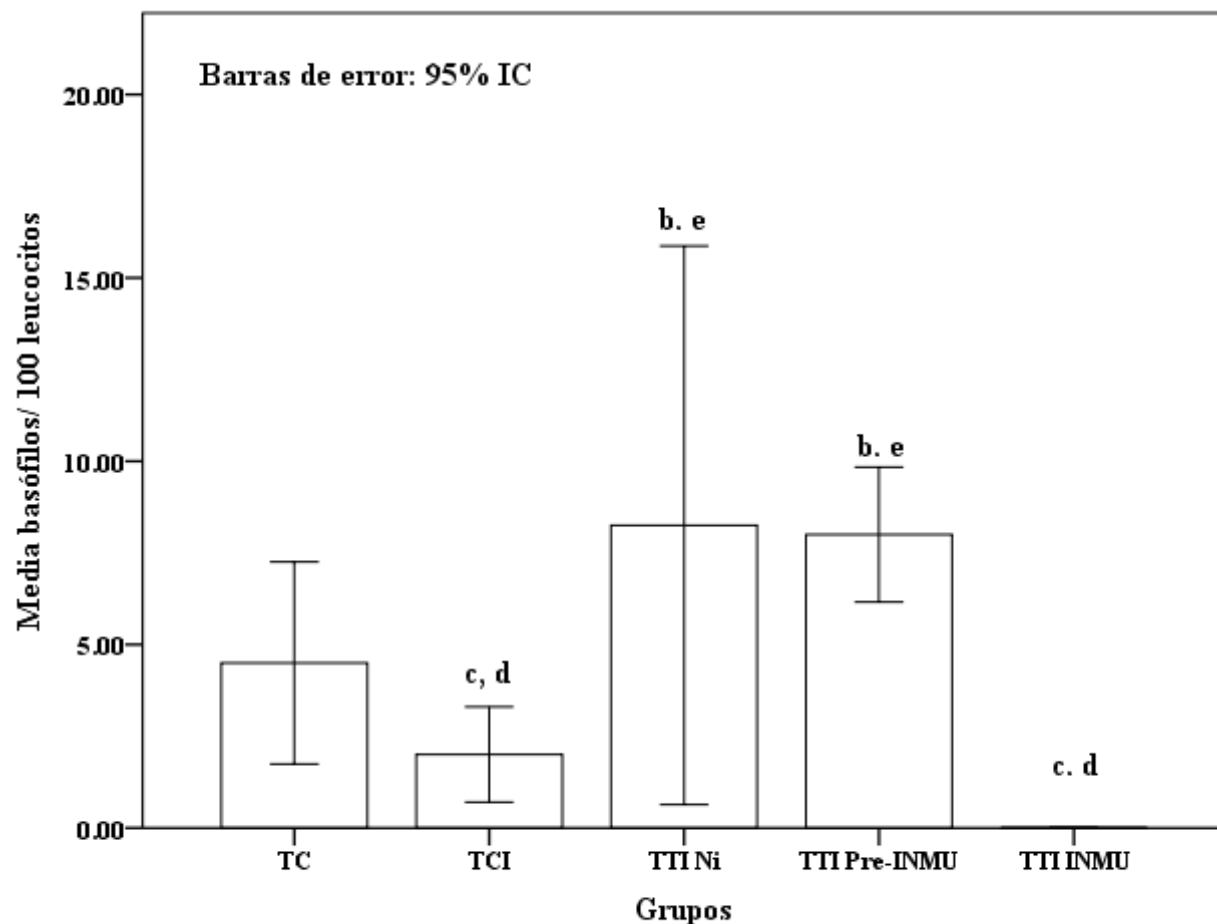


Figura 16. Conteo diferencial de monocitos en sangre periférica de *D. virginiana* sometidos a tratamiento de inmunosupresión e infectados con *G. turgidum*.

Se presenta la comparación del conteo diferencial de monocitos entre grupos TC, TCI, TTI Ni, TTI Pre-INMU y TTI INMU (número de animales para cada grupo= 4). Las barras representan la media de cada grupo y las barras el error estándar. Las letras sobre las barras señalan diferencia estadística entre grupos. Valor de significancia para prueba de Tukey, $p < 0.05$.



- a:** diferencia estadística con TC
- b:** diferencia estadística con TCI
- c:** diferencia estadística con TTI Ni
- d:** diferencia estadística con TTI Pre-INMU
- e:** diferencia estadística con TTI INMU

Figura 17. Conteo diferencial de basófilos en sangre periférica de *D. virginiana* sometidos a tratamiento de inmunosupresión e infectados con *G. turgidum*.

Se presenta la comparación del conteo diferencial de basófilos entre grupos TC, TCI, TTI Ni, TTI Pre-INMU y TTI INMU (número de animales para cada grupo= 4). Las barras representan la media de cada grupo y las barras el error estándar. Las letras sobre las barras señalan diferencia estadística entre grupos. Valor de significancia para prueba de Tukey, $p < 0.05$.

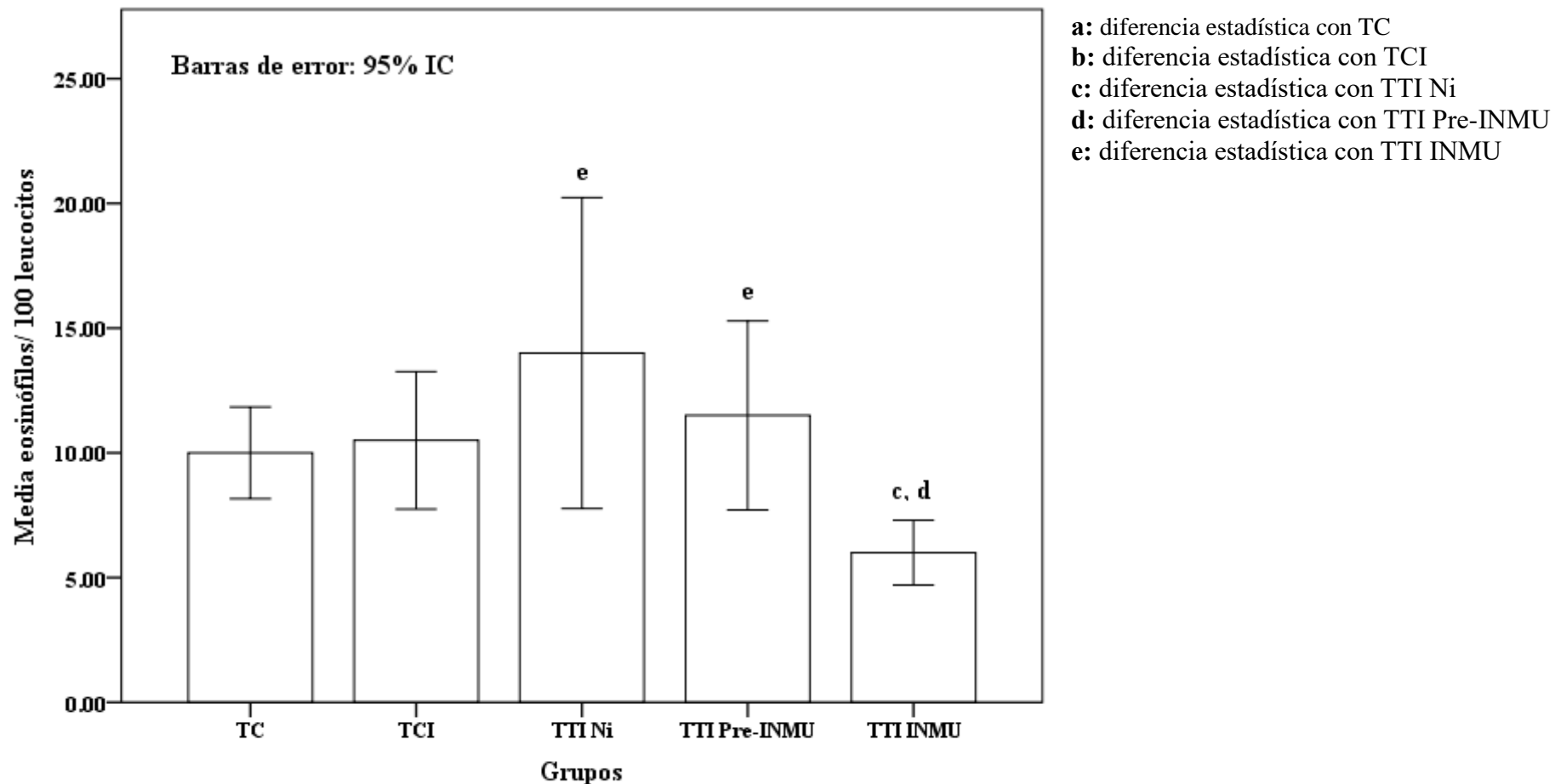


Figura 18. Conteo diferencial de eosinófilos en sangre periférica de *D. virginiana* sometidos a tratamiento de inmunosupresión e infectados con *G. turgidum*.

Se presenta la comparación del conteo diferencial de linfocitos entre grupos TC, TCI, TTI Ni, TTI Pre-INMU y TTI INMU (número de animales para cada grupo= 4). Las barras representan la media de cada grupo y las barras el error estándar. Las letras sobre las barras señalan diferencia estadística entre grupos. Valor de significancia para prueba de Tukey, $p < 0.05$.

9.8. Evaluación del daño histopatológico de hígado y estómago causado por *G. turgidum* en *D. virginiana*

9.8.1. Evaluación histopatológica de hígado

Las secciones histológicas de los hígados de los tlacuaches del grupo TC utilizados como control no mostraron alteraciones, los hepatocitos que conforman estructuras portas, venas centrales y parénquima se observaron sin indicios de estrés o daño, así mismo la conformación de la estructura porta y vena central no presento anomalías histopatológicas y hubo ausencia de procesos inflamatorios asociados a daño. En comparación con los TC en los cortes de hígados de los tlacuaches del grupo TCI que fueron sometidos a inmunosupresión, se observó degeneración hidrópica, congestión, edema e hiperplasia de conductos biliares (Figura 19A, B). Respecto a los hígados de los grupos de tlacuaches infectados con *G. turgidum*, en el grupo TTI Ni se observó evidencia de daño tisular con respuesta inflamatoria de tipo supurativa causada por L3A (Figura 19C). El tejido hepático mostró evidente degeneración hidrópica, focos necróticos hemorragias con abundante infiltrado inflamatorio de células polimorfonucleares y zonas con estructuras de tipo cuerpo extraño (Figura 20D). En tanto, los hígados de los animales del grupo TTI INMU mostraron degeneración hidrópica con múltiples focos de necrosis con abundante infiltrado inflamatorio (Figura 20E, F). Al comparar la histopatología, se observó daño tisular severo en el grupo TTI INMU en comparación con el grupo TTI Ni que mostró un daño patológico moderado.

La tinción tricrómica mostró en el grupo TCI ligera fibrosis (Figura 21A) y discreto infiltrado inflamatorio supurativo periportal e hiperplasia de conductos biliares (Figura 21B). Así mismo, se observó un proceso fibrótico con zonas de edema en el parénquima hepático del grupo TTI Ni (Figura 21C, D). en cuanto a los tlacuaches del grupo TTI INMU la tinción

mostró zonas fibróticas en el parénquima hepático, así como en la periferia de los nódulos causados por el parásito (Figura 20E, F).

9.8.2. *Evaluación histopatológica de estómago*

Los cortes histológicos de estómago del grupo control TC se observaron sin alteraciones patológicas aparentes, mientras que los tlcuaches del grupo TCI presentaron trastorno circulatorio con congestión y una moderada atrofia de la mucosa gástrica (Figura 21A, B). Los tlcuaches del grupo TTI Ni desarrollaron un marcado foco necrótico perinodular con escasa respuesta inflamatoria que abarcaba desde la submucosa hasta la capa muscular de estómago (Figura 21C, D), el daño fue causado por la presencia del nemátodo adulto *G. turgidum* que se encontraba al interior del nódulo necrótico.

En comparación al grupo TTI Ni, los tlcuaches del grupo TTI INMU desarrollaron nódulos con necrosis (Figura 21E), con moderado infiltrado inflamatorio tipo granulomatoso (Figura 21F). Se pudo observar respuesta inmune de tipo cuerpo extraño y fue evidente también zonas de calcificación distrófica en submucosa (Figura 201F). La tinción tricrómica de Masson de los cortes de estómago mostró en grupo TC una constitución histológica sin cambios aparentes, en tlcuaches TCI la descripción histológica coincidió con lo observado en la tinción hematoxilina y eosina (Figura 22A, B). En ambos grupos de tlcuaches infectados TTI Ni (Figura 22C, D) y TTI INMU (Figura 22E, F), se observó un evidente proceso fibrótico alrededor de las lesiones causadas por el parásito que se extendía hasta la capa muscular.

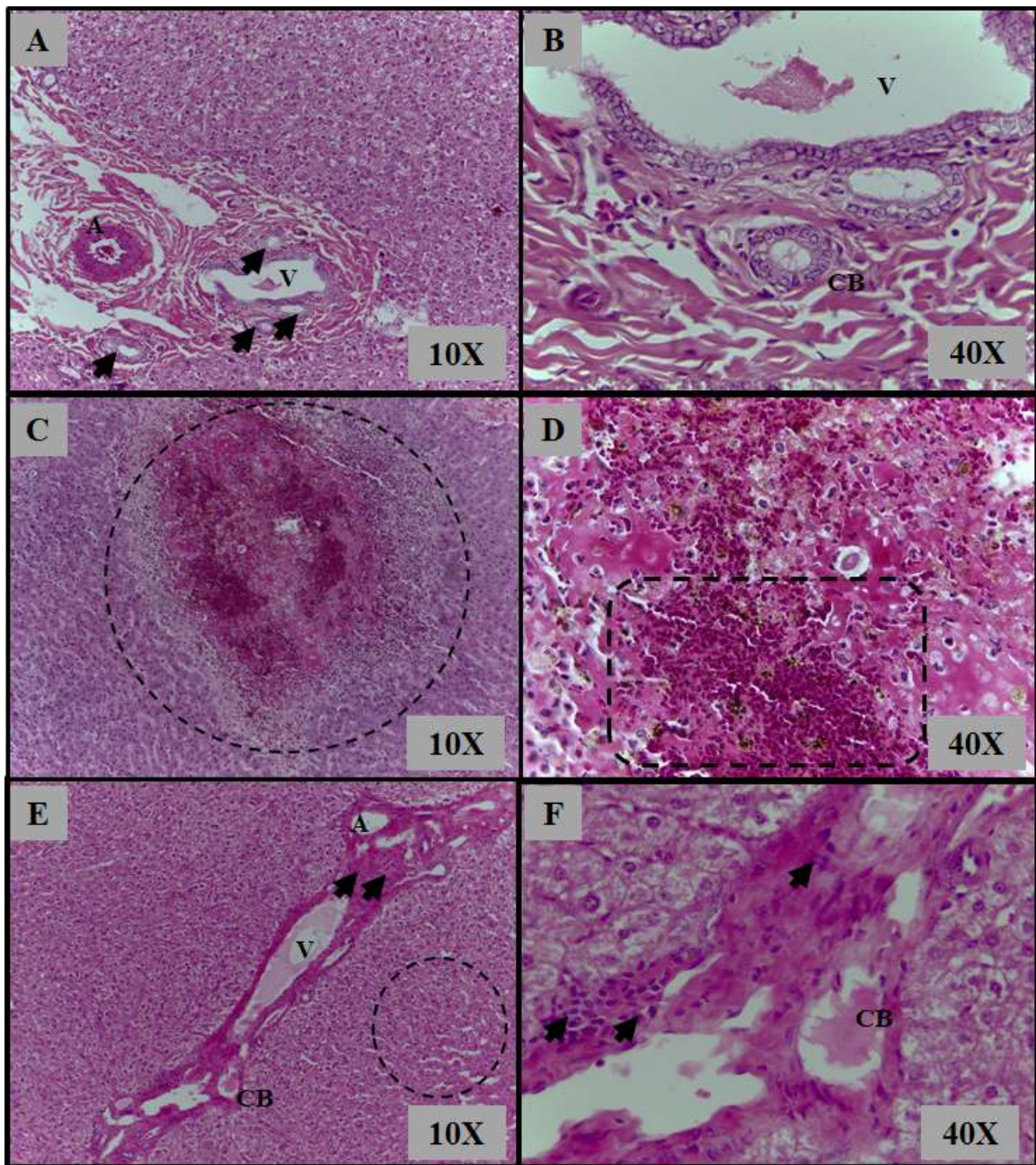


Figura 19. Cortes histológicos de hígado de *D. virginiana* de los grupos control inmunosuprimidos, infectados e infectados inmunosuprimidos, tinción hematoxilina y eosina.

A) Se muestran cortes histológicos representativos de los hígados del grupo TCI con hiperplasia de conductos biliares (cabezas de flecha), B) ampliación, C) histología de hígado de tlacuaches del grupo TTI Ni donde se observa focos necróticos y hemorragias con abundante infiltrado inflamatorio (circulo punteado), zonas con estructuras de tipo cuerpo extraño (rectángulo punteado), D) ampliación, E) cortes de tejido hepático representativo del grupo TTI INMU donde se observan focos de degeneración hidrópica (circulo punteado) con abundante infiltrado inflamatorio (cabezas de flechas), F) ampliación. Arteria (A), Vena (V), Conducto biliar (CB).

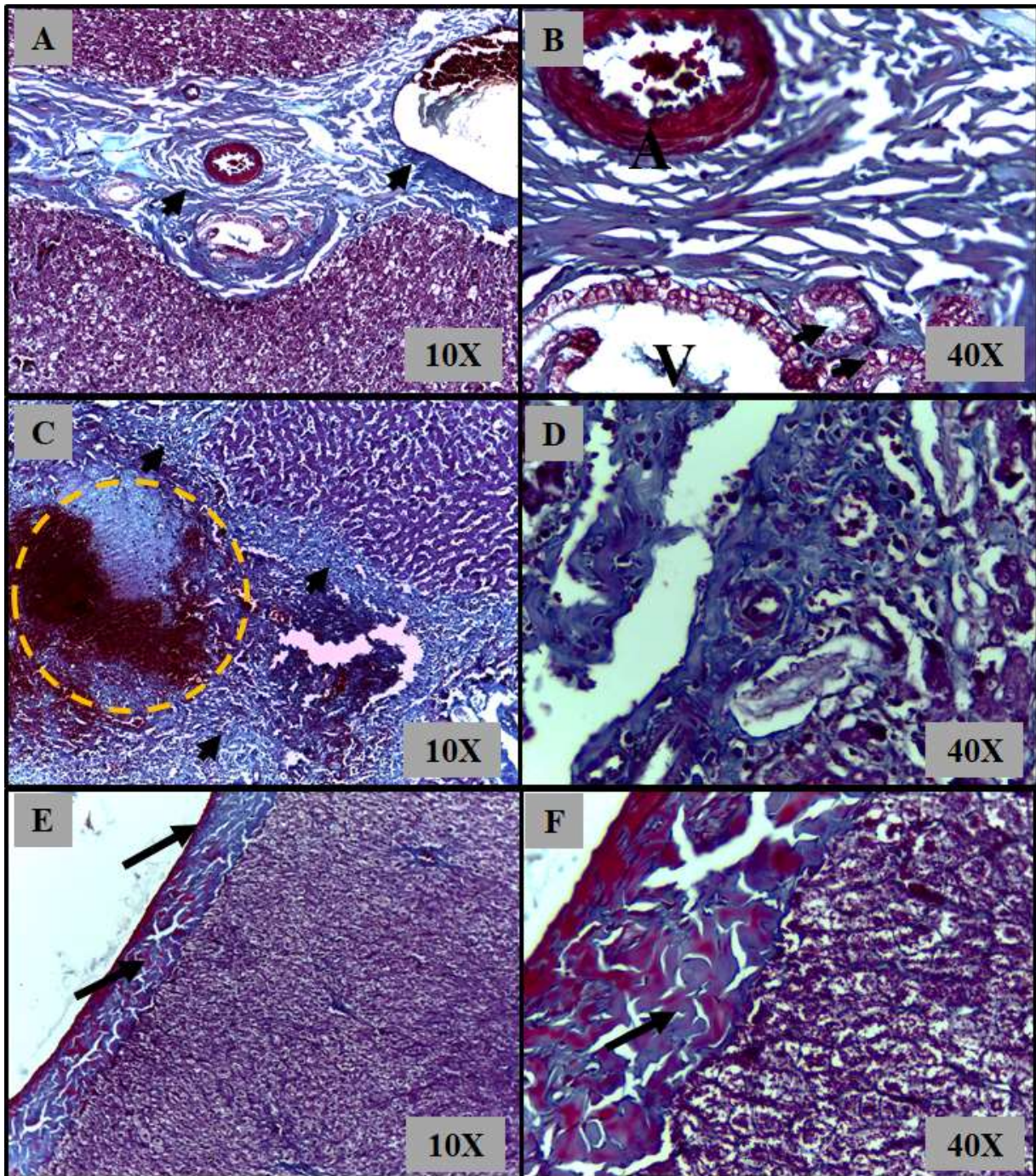


Figura 20. Cortes histológicos de hígado de *D. virginiana* de los grupos control inmunosuprimidos, infectados e infectados inmunosuprimidos, tinción tricrómica de Masson.

Se observa en A) fibrosis periportal (cabezas de flecha) y B) hiperplasia de los conductos biliares (cabezas de flecha) en hígado de los tlacuaches TCI. En el grupo TTI Ni se observó C) proceso fibrótico (cabezas de flecha) con zonas de edema (circulo punteado), D) amplificación. En el grupo TTI INMU y E) un marcado proceso fibrótico en el parénquima hepático en la periferia de las lesiones causadas por *G. turgidum* (flechas), F) amplificación. Arteria (A), Vena (V), Conducto biliar (CB).

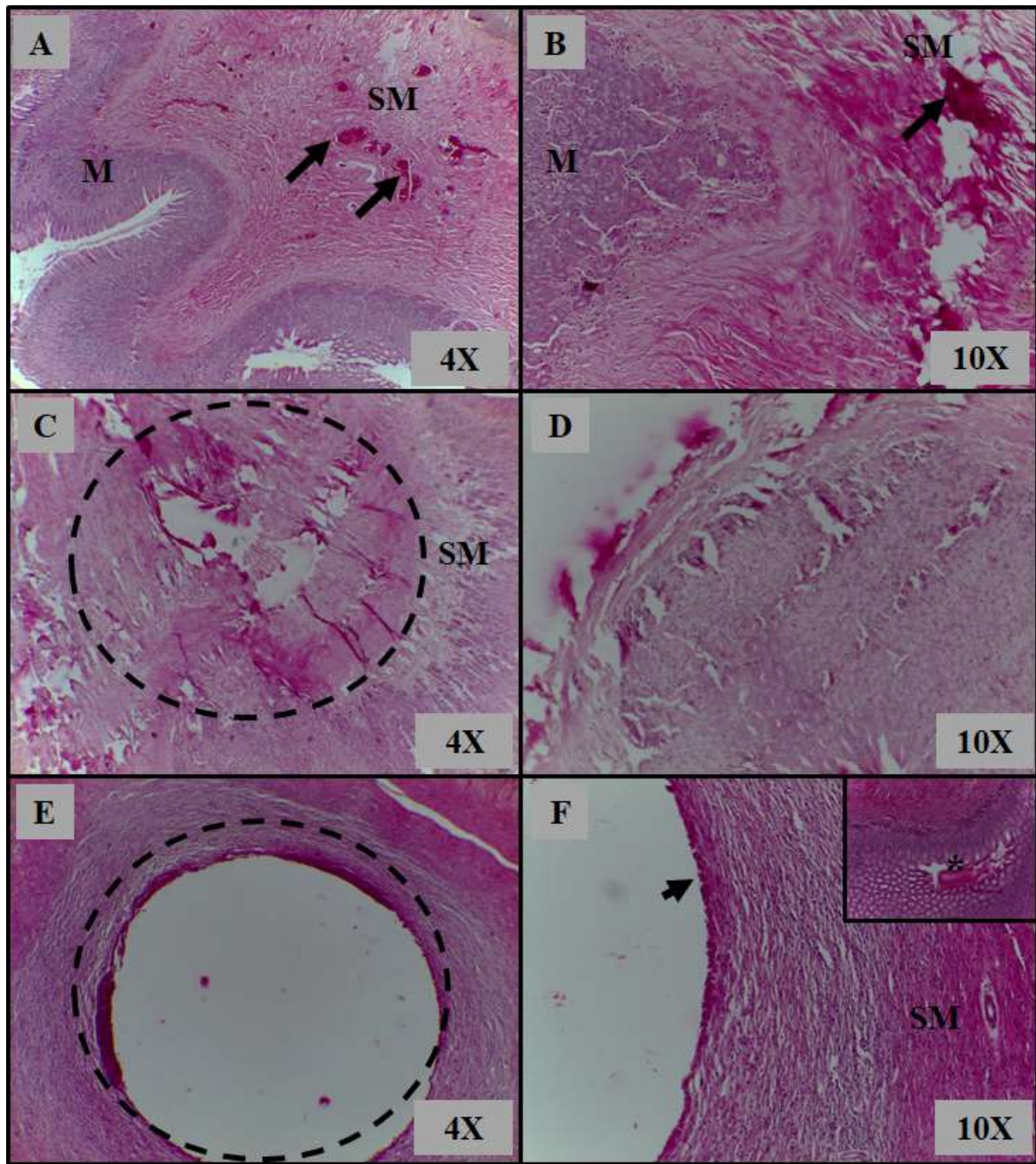


Figura 21. Cortes histológicos de estómago de *D. virginiana* de los grupos control inmunosuprimidos, infectados e infectados inmunosuprimidos tinción hematoxilina y eosina.

A) Se observa en el tejido estomacal de animales del grupo TCI trastorno circulatorio con congestión (flechas), B) ampliación, C) En el grupo TTI Ni se observaron marcados focos necróticos perinodulares con escasa respuesta inflamatoria (circulo punteado), que abarcaba desde la submucosa (M) hasta la submucosa y capa muscular, D) ampliación, E) cortes histológicos de estómago de animales del grupo TTI INMU donde se desarrollaron nódulos con necrosis (circulo punteado), F) moderado infiltrado inflamatorio (cabeza de flecha) y zonas de calcificación (recuadro negro calcificación marcada con asterisco). SM) submucosa, M) mucosa.

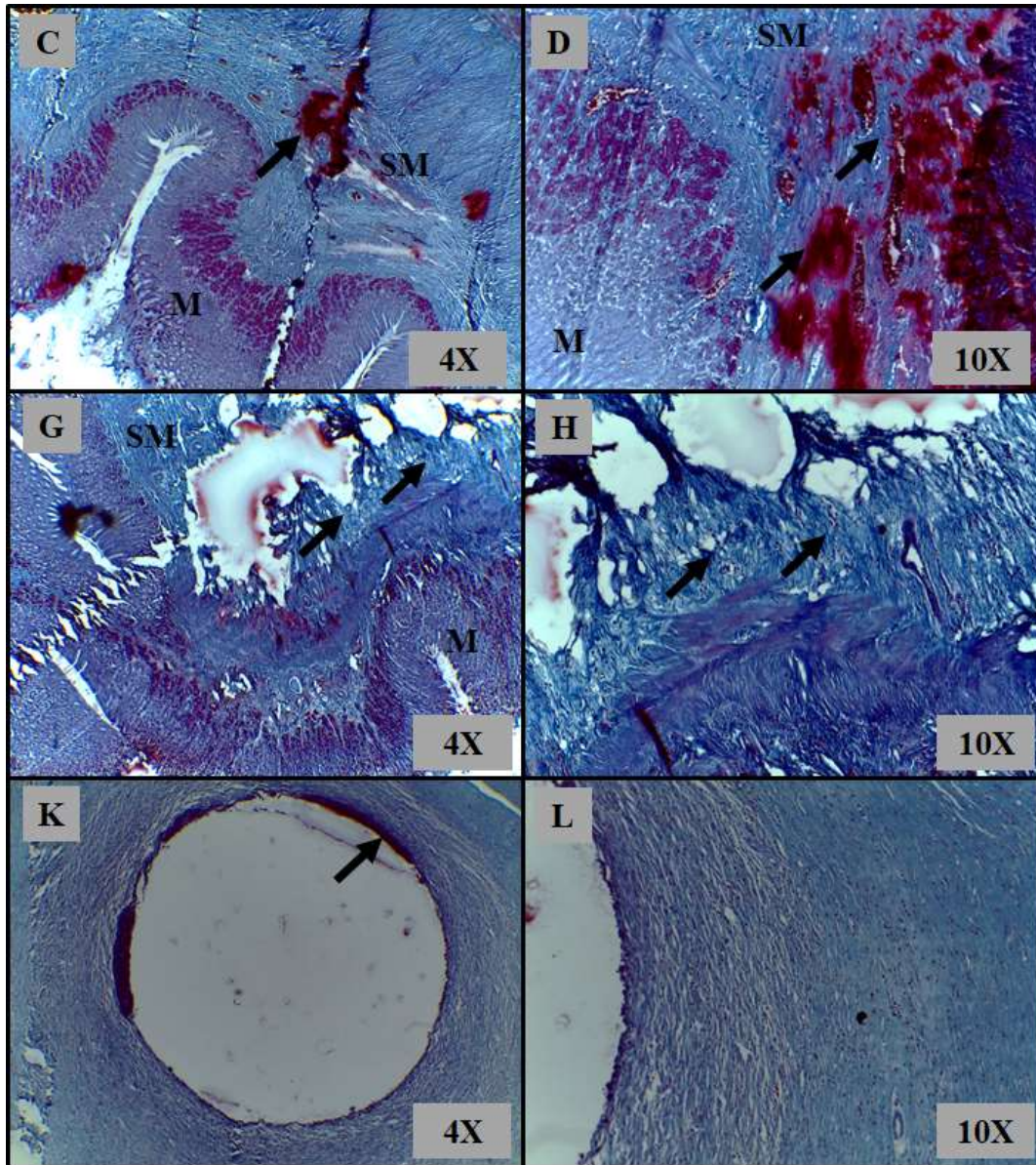


Figura 22. Cortes histológicos de estómago de *D. virginiana* de los grupos control inmunosuprimidos, infectados e infectados inmunosuprimidos tinción tricrómica de Masson.

A) La tinción tricrómica de Masson con firma la congestión y edema (flechas) observadas en H y E en el grupo TCI, B) ampliificación. C) se observa en el grupo TTI Ni evidente fibrosis en la submucosa (cabeza de flecha), D) ampliificación. E) en el grupo TTI INMU se observa respuesta inmune de tipo cuerpo extraño (flecha) y F) desarrollo de un proceso fibrótico. SM) submucosa, M) mucosa.

X. DISCUSIÓN

10.1. Primeros estudios de *Gnathostoma* en Sinaloa

Gnathostoma turgidum fue descrito por primera vez hace más de 100 años como un parásito gástrico *Didelphis azarea* capturado en Argentina (Stossich, 1902), después fue reportado en *D. aurita* por Travassos en 1925, posteriormente por Dikmans en 1931 en un tlacuache común *D. virginiana* y un año después fue reportado en *D. marsupialis* por Chandler. En México, Caballero y Caballero describieron por primera vez a *Gnathostoma* sp. en estómago de *D. marsupialis* que después sería reclasificada como *G. turgidum* por Lamote-Argumedo y cols. 1998. Por su parte, Sinaloa cuenta con el registro de un área endémica de la infección de *G. turgidum* en *D. virginiana* en donde además se han reportado casos de gnathostomosis humana causada por el consumo de carne de *Eliotris picta* infectada con L3A de *G. binucleatum* (Díaz-Camacho y cols. 2003, 2009). La infección de *G. turgidum* en *D. virginiana* se ha observado con cambios estacionales, con prevalencias del 100% durante la estación lluviosa en el área endémica (Nawa y cols. 2009). También ha sido estudiada la migración intrahepática de larvas L3A de *G. turgidum*, su posterior migración, establecimiento y maduración a su estadio adulto en el estómago de *D. virginiana* (Díaz-Camacho y cols. 2010). Así mismo, en el seguimiento de estudios sobre el ciclo de vida del parásito se ha reportado la expulsión de gusanos adultos de *G. turgidum* en heces de *D. virginiana* y se ha propuesto un aparente fenómeno conocido como cura espontánea que podría estar siendo regulado por sistema inmunológico del hospedero y/o por el ciclo de vida de *G. turgidum* (Torres-Montoya y col. 2014). Recientemente, se estudió el daño que *G. turgidum* causa en el tejido hepático y estomacal durante su migración y maduración en *D. virginiana* (Torres-Montoya y col. 2017).

Aunque se han estudiado algunos aspectos de la interacción hospedero-parásito entre *G. turgidum* y *D. virginiana*, aún sigue sin conocerse cuales son los factores que determinan fenómenos como el de la cura espontánea, es decir, no se puede asumir que el fenómeno esté ocurriendo por la participación del sistema inmune de los tlacuaches, por el ciclo de vida propio del parasito o bien por una combinación de ambos. Además, respecto al ciclo de vida de *G. turgidum* en Sinaloa, se desconoce cuáles son los hospederos intermediarios que participan en mantener el ciclo de infección y por tanto el comportamiento estacional del parásito. Incluso, se desconoce que vertebrado está cumpliendo el rol de hospedero definitivo de *G. binucleatum*, especie reportada como agente causal de gnathostomosis humana en Sinaloa.

10.2. Evaluación de *M. edax* como hospedero intermediario de larvas de *G. turgidum*

Relacionado a la búsqueda de hospederos para especies de *Gnathostoma*, algunas investigaciones han sido dirigidas a evaluar el desarrollo de larvas de *Gnathostoma* en posibles hospederos intermediarios para un mejor entendimiento del ciclo biológico y de sus participantes. En previos estudios se ha reportado que la incubación de los huevos de las diferentes especies de *Gnathostoma* estudiadas, resulta en la eclosión de larvas L2 entre los días 8-11 y se describe una larva con movimientos serpenteantes enérgicos, con ausencia de bulbo cefálico desarrollado y una vaina membranosa transparente que cubre el cuerpo del gusano; sin embargo, aunque las características morfológicas de las larvas L2 de *G. turgidum* de esta investigación coinciden con las de larvas L2 reportadas en otros estudios, los tiempos de eclosión difieren, registrándose hasta los días 22-24. La discordancia en la ocurrencia de la eclosión puede ser explicada por la intensidad de ovoposición y factores bióticos como temperatura, salinidad, pH y la profundidad del medio acuoso donde se lleve a cabo la

embriogénesis de las larvas (Gaspar-Navarro y col. 2013; Janwan y col. 2011; Mosqueda-Cabrera y col. 2010; Almeyda-Artigas y col. 1995).

Respecto a la evaluación de posibles hospederos intermediarios, en el presente estudio fueron utilizados copépodos. Las especies fueron identificadas morfológicamente como *Leptodiatomus siciloides*, *Arctodiatomus dorsalis* y *Mesocyclops edax*. Al ser incubados con larvas L2 de *G. turgidum*, sólo *M. edax* fue susceptible a la infección. Esta especie de copépodo ha sido reportada como susceptible a la infección por *G. binucleatum* y ha sido propuesto como posible primer hospedero intermediario para la misma (Almeyda-Artigas y col, 1995). También se ha propuesto a copépodos del género *Mesocyclops* como hospederos de otras especies de *Gnathostoma* como: *G. spinigerum* y *G. turgidum* (Gaspar-Navarro y col. 2013; Janwan y col. 2011; Mosqueda-Cabrera y col. 2010); sin embargo, se requieren más estudios para corroborarlo.

En ese sentido, durante la interacción *in vitro* de *M. edax* y larvas L2 de *G. turgidum* llevada a cabo en este estudio fue evaluada la eficiencia depredativa del copépodo. Se observó que la media de depredación aumentó conforme se aumentaba la densidad de larvas, con medias de 3.5 ± 0.327 en los copépodos expuestos a una densidad de 5 larvas, 7.5 ± 0.681 en los copépodos expuestos a 10 larvas y 10.88 ± 1.025 en los expuestos a 15 larvas. El número de larvas depredadas fue estadísticamente significativo al comparar los grupos por densidad ($p < 0.05$). En contraparte al aumento de la ingestión de larvas proporcional a la densidad, no se observó diferencia estadística entre la densidad de larvas infectantes en cada una de las densidades (Kruskal-Walis, $p = 0.849$).

El comportamiento observado respecto del número de larvas ingeridas contrastado con la densidad puede ser explicado por la forma de alimentación de los copépodos. Se ha

reportado que la capacidad de detección de las presas de copépodos cyclopoideos depende de la disturbancia mecánica generada por las presas al nadar y que los copépodos no son capaces de detectar presas a distancias mayores a 3 mm (Tranchida y col. 2009, Williamson, 1986). En este sentido, el comportamiento observado del copépodo en el presente estudio podría deberse a que, al aumentar la densidad de larvas durante interacciones, el espacio entre la presa y el depredador se reduce, lo que genera una mayor posibilidad de detección y depredación.

En cuanto al número de larvas con las que el copépodo se infecta los análisis estadísticos muestran una tendencia similar independiente del número de larvas ingeridas ($J-T= 98.500$, $z= 0.142$, $p=0.887$). De acuerdo con algunas investigaciones sobre la interacción de parásitos que utilizan copépodos como primeros hospederos intermediarios, el tamaño del cuerpo y el número de parásitos infectantes está directamente relacionado con el tamaño del cuerpo del copépodo. Se ha observado que helmintos que aprovechan rutas tróficas similares, tienden a tener un tamaño y edad similar en la infectividad, mientras que en aquellos transmitidos por copépodos a peces mantienen un fenotipo común, tal es el caso de cestodos que exhiben un tamaño pequeño de las larvas, pero que en su siguiente hospedero logra conseguir un tamaño variable que no está relacionado con el tamaño en el copépodo. El tamaño del parásito en el segundo hospedero depende del papel del hospedero en el ciclo de vida. Si el segundo hospedero es el hospedero definitivo, las especies tienden a crecer substancialmente, mientras que, si es otro hospedero intermediario, las especies pueden o no crecer (Benesh, 2016, Benesh y col. 2011).

10.3. Evaluación de anuros del género *Rana* como posibles hospederos intermediarios de *G. turgidum*

Respecto a la infección experimental de anuros del género *Rana* y su evaluación como segundos hospederos, solo se detectó un posible quiste con una L3A con desarrollo incompleto en el tejido muscular dorsal de uno de los 50 anuros sometidos a la interacción con copépodos infectados con L3T de *G. turgidum*. Resultados negativos también se han reportado durante infecciones experimentales con *G. spinigerum* en langostinos de la especie *Macrobrachium lanchesteri* y anuros de la especie *R. regulosa*. En investigaciones anteriores con anuros solo se ha observado que 11 de 60 (18.3%) resultaron positivos a la infección con desarrollo incompleto de L3A (Sukontason y col. 2001). En contraste existen estudios donde se ha infectado experimentalmente a adultos de la especie *R. pipiens* que ha mostrado intensidades de infección de 23 a 419 larvas por individuo, sin embargo, en vida silvestre la especie de *R. zweifeli* ha sido la especie encontrada naturalmente infectada, incluso tortugas de la especie *K. integrum* han sido reportadas como hospederos paraténicos (Mosqueda-Cabrera y col. 2009), aunque no es claro si puede considerarse como un hospedero paraténicos o intermediario secundario, debido a que se sugiere que el mecanismo por el que las ranas adultas y las tortugas adquieren la infección es por la depredación de anuros o peces que consumen copépodos infectados y que son capaces de mantener viable las L3T durante algunos días.

Además, existe controversia sobre el rol de los anfibios como hospederos de *G. turgidum* debido a que mientras en algunos estudios se reportan como hospederos idóneos a especies del género *Rana*, en otros estudios no concuerdan los resultados debido a la dificultad que ha representado mantener la infección en condiciones de laboratorio en especímenes del

género *Lithobates* (Gaspar-Navarro y col. 2013), aunado a lo anterior, de acuerdo a la reclasificación de especies, actualmente se asume a las especies anteriormente del género *Rana* reordenadas dentro del género *Lithobates*, lo que se sugiere que existen filtros de compatibilidad para eliminar especies de hospederos que no permiten la coexistencia con el parásito debido a razones morfológicas o inmunológicas propias del hospedero (Combes, 2001). Son necesarios más estudios que determinen las especies de vertebrados que están participando en el ciclo de vida de *G. turgidum* en Sinaloa, posiblemente factores como la especificidad de especie en la selección de hospederos además de la disponibilidad de hospederos en las zonas de distribución de *Gnathostoma* en el estado, podrían estar ocasionando variaciones en cuanto a los hospederos intermediarios en el ciclo de vida.

En ese sentido, el estudio de las interacciones biológicas en las interacciones hospedero-patógeno actualmente es un campo emergente y en constante evolución. Actualmente, el estudio de enfermedades como la gnathostomosis, se abordan desde la perspectiva de entender los ciclos biológicos de su agente causal. Es así que es necesario entender su comportamiento durante las interacciones con sus hospederos para determinar factores, como los mecanismos de selección del parásito, estrategias de evasión de las respuestas inmunológicas del hospedero, los cambios patológicos y parasitológicos que se ocasionan durante la interacción, factores que participan en el desarrollo del parásito y que influyen en su infectividad, entre otros. Debido a que, el esclarecimiento de estos factores podría facilitar en desarrollo de estrategias de prevención en la ocurrencia de la enfermedad, además del desarrollo de tratamientos contra el parásito (Sen y col. 2016).

10.4. Tipificación de los niveles de células leucocitarias de *D. virginiana* inmunosuprimidos y no inmunosuprimidos infectados con *G. turgidum* y estudiar su relación con la cura espontánea.

Respecto a al conteo total de leucocitos sistémicos en los grupos de tlacuaches formados para este trabajo, fue interesante la diferencia que se observó entre el grupo TTI Ni con medias de $354,500 \pm 18,945$ leucocitos/mm³ y el grupo TTI INMU con valores de $132,750 \pm 9,961$ leucocitos/mm³ ($p < 0.05$). Los resultados sugirieron que tratamiento tuvo una tendencia inmunosupresora, si se toma en cuenta que el grupo los valores medios que tuvo el grupo TTI INMU previo a al tratamiento inmunosupresor (TTI Pre-INMU= $129,000 \pm 10,400$ leucocitos/mm³) y que el muestreo fue realizado aproximadamente un mes antes del inicio del tratamiento inmunosupresor, cuando la infección de acuerdo con la estacionalidad reportada para *G. turgidum* se encuentra en sus etapas iniciales en *D. virginiana*, así mismo, se puede proponer que la respuesta inmunológica a la infección crónica del parásito pudo haber mantenido los niveles de leucocitos equiparables al estado previo al tratamiento; sin embargo, al mismo tiempo se mantuvo muy por debajo del conteo del grupo TTI Ni con diferencias estadísticamente significativas. Por otro lado, al analizar los resultados de los conteos totales se pudo observar que los niveles leucocitarios del grupo TTI INMU no mostraron diferencias significativas comparados con los conteos totales de los grupos TC y TCI, por ello, podría sumirse en contraparte que el tratamiento inmunosupresor fue ineficiente, ya que se esperaría que un efecto positivo de corticoide afectara y disminuyera los niveles de leucocitos del grupo infectado por debajo de los niveles de los controles para ser tomado como un tratamiento inmunosupresor con éxito. También debe considerarse que, aunque los niveles leucocitarios de los animales sometidos a inmunosupresión no fueron significativamente menores a los controles, se observó una tendencia decreciente de los niveles hasta llegar a niveles similares a

los mostrados por los grupos TC y TCI, lo que sugiere que de algún modo el tratamiento tuvo algún efecto inmunosupresor.

Se ha sugerido que las infecciones por nematodos gastrointestinales influyen selectivamente en algunos parámetros de la respuesta inmune celular. En infecciones de ovejas con *Trichostrongylus colubriformis*, se ha observado que la blastogénesis de linfocitos alcanza un punto máximo entre la semana 2 y 7 de infección, posteriormente vuelven a los niveles iniciales, así mismo, se observó que los recuentos de eosinófilos aumentan significativamente hasta una semana antes en ovejas resistentes a la infección que en ovejas susceptibles a la infección (Pernthaner, A. y col. 1995). Tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa participan en la muerte o expulsión de nematodos parásitos gastrointestinales o bien en la exacerbación de la enfermedad. Cuando la mucosa gástrica o intestinal es penetrada por los nematodos, las interacciones entre el epitelio, células linfoides, células presentadoras de antígeno como dendríticas y macrófagos, son estimulados para generar una respuesta inmune junto a la regulación con la fijación de complemento y secreción de moco para resistir la infección (McRae y col. 2015). El estímulo de la presentación de antígenos de parásitos nematodos en mamíferos induce una respuesta inmune principalmente asociada con una del tipo humoral coordinada por linfocitos Th2, en la que se secretan citosinas IL3, IL4, IL5, IL9, IL10 e IL13 (Abo-Aziza y col. 2017). La secreción de citosinas deriva en mecanismos de células efectoras que incluyen eosinófilos y mastocitos (Kandil y col. 2017).

Se conoce que los helmintos parásitos tienen capacidad de manipular y modular en su beneficio la respuesta inmune del hospedero. Se ha estudiado en infecciones principalmente de rumiantes parásitos nematodos de los géneros *Haemonchus*, *Cooperia*, *Ostertagia*, *Teladorsagia*, *Bunostomum*, *Trichostrongylus*, *Oesophagostomum*, *Chabertia*, *Nematodirus*,

Protostrongylus y *Trichuris* (Amarante y Amarante, 2016; Belina y col. 2016) y de acuerdo con los estudios la relación parásito-hospedero puede manifestarse en diferentes fenómenos, hipobiosis larvaria, expulsión de estadios adultos, decremento de la fecundidad de las hembras y cambios en los caracteres morfológicos de los parásitos adultos. Así mismo, existen factores que pueden influir en la respuesta inmune del hospedero, estos factores pueden ser, la constitución genética, edad o estado fisiológico o estado nutricional (McRae y col. 2015; González-Garduño y col. 2017).

En cuanto la inmunomodulación de *Gnathostoma* sobre sus hospederos, solo existen estudios *in vitro* con *G. spinigerum*, donde se ha demostrado que antígenos de secreción-excreción de parásito pueden inhibir la proliferación de linfocitos de ratón (Saksirisampant y col. 2012). Aunque los mecanismos de la respuesta inmune en hospederos naturales de *Gnathostoma* es desconocida, los resultados sugieren que: 1) el tratamiento de inmunosupresión funcionó manteniendo los niveles de células leucocitarias similares a las del grupo TC, 2) los niveles de leucocitos observados en el grupo TTI INMU pueden deberse a la inmunomodulación que *G. turgidum* ejerce sobre *D. virginiana* durante la interacción hospedero-parásito y que puede ser acompañada por la edad, estado nutricional del tlacuache e incluso a reacciones inmunosupresoras ocasionadas por el estrés durante adaptación al cautiverio, a la que cada individuo puede reaccionar diferente, 3) una combinación de ambas sugerencias. Son necesarios más estudios que se enfoquen a esclarecer los mecanismos inmunológicos concretos que actúan en respuesta a *Gnathostoma* en sus diferentes hospederos, así como los mecanismos que el parásito utiliza para inmunomodular al hospedero. En el presente estudio, aunque no se caracterizó de manera específica los mecanismos

inmunológicos durante la interacción hospedero-parásito, se realizó el conteo diferencial de los niveles de estirpes celulares leucocitarias.

10.5. Conteo diferencial de neutrófilos en sangre periférica de *D. virginiana* con y sin tratamiento inmunosupresor e infectados con *G. turgidum*

Aunque el en el conteo total de leucocitos no se observó diferencia entre el grupo TTI Pre-INNMU y el grupo TTI INMU, diferente a lo esperado al realizar el conteo diferencial, se observó una clara diferencia entre estos grupos ($p < 0.05$) respecto al número de neutrófilos por cada 100 células leucocitarias. En ese sentido el grupo TTI INMU obtuvo valores similares a los controles TC, TCI. Lo que puede explicar que el tratamiento inmunosupresor, aunque no tuvo el afectó esperado el número total de leucocitos, si pudo haber actuado de forma específica sobre algunas estirpes leucocitarias durante la infección de *D. virginiana* con *G. turgidum*.

Entre los granulocitos, los neutrófilos son efectivos en la fagocitosis, pueden engullir y matar microorganismos produciendo especies reactivas de oxígeno en los fagolisosomas. Sin embargo, los helmintos son muy grandes para ser fagocitados. Aunque los neutrófilos generalmente son poco estudiados en las respuestas efectoras contra helmintos (Oppenheim y Yang, 2005), se ha demostrado de manera concluyente que los neutrófilos pueden ser efectivos en las respuestas inmunitarias durante infecciones con *Strongyloides sp.* (Herbert y col. 2002) y para controlar *Streptococcus ratti* en infecciones experimentales de ratones (Watambe y col. 2000), dado que se ha demostrado que la mieloperoxidasa y elastasa purificada de neutrófilos humanos es tóxica para *Trichinella spiralis*, *Schistosoma mansoni* y *S. stercoralis* (Jong y col. 1981; Buys y col. 1984; Freudenstein-Dan y col. 2003; O'Connell y col. 2011).

De acuerdo con la Oposum Society of the Unotes States (OSUS) los valores normales de neutrófilos en sangre de tlacuaches son de entre 40-50%. En los animales infectados sin tratamiento inmunosupresor del presente estudio se observaron valores por encima del 60%, estos resultados sugieren que los neutrófilos podrían estar participando de forma directa e incluso más activa que los propios eosinófilos en *D. virginiana* infectados con *G. turgidum*, incluso podrían estar siendo activados como respuesta alternativa durante infecciones crónicas cuando las estrategias de inmunomodulación del parásito limitan la respuesta adaptativa inhibiendo la proliferación de linfocitos como se ha demostrado para *G. spinigerum* (Saksirisampant y col. 2012). Debe ser de especial interés el estudio de los productos enzimáticos de neutrófilos activados en respuesta a parásitos de *Gnathostoma* ya que como se ha demostrado, son tóxicos para otras especies de nematodos y la investigación podría llevar a dilucidar las enzimas de neutrófilos participan en la respuesta inmune de *D. virginiana* contra *G. turgidum*, además, alternativamente a la búsqueda de tratamientos alternativos para la gnathostomosis humana basados en esas enzimas aisladas de neutrófilos de los diferentes hospederos del parásito.

10.6. Conteo diferencial de linfocitos en sangre periférica de *D. virginiana* con y sin tratamiento inmunosupresor e infectados con *G. turgidu*

En contraste a los resultados de los neutrófilos, el porcentaje de linfocitos disminuyó drásticamente por debajo de los valores establecidos por la OSUS en los animales infectados TTI Ni y TTI pre-INMU, por el contrario, en los animales control e infectados inmunosuprimidos TC, TCI y TTI INMU los porcentajes se mantuvieron dentro de los valores de referencia. El resultado puede explicarse debido a la evidencia que existe sobre la capacidad inmunosupresora que especies como *G. spinigerum* tienen sobre la proliferación de

linfocitos (Saksirisampant y col. 2012), aunque se desconoce si *G. turgidum* puede provocar respuestas similares en sus hospederos. En animales y humanos infectados con filarias se produce un hiporespuesta de linfocitos, es decir, se inhibe la proliferación en respuesta a la infección, este tipo de mecanismos de evasión inmune por parte de nematodos se le atribuye a la capacidad que tienen de bloquear receptores de antígenos específicos de los linfocitos (Harnett y Harnett, 2008).

Aun no es claro cuál es mecanismo por el cual *Gnathostoma* inhibe la proliferación de linfocitos; sin embargo, se sabe que en linfocitos obtenidos de personas sanas y posteriormente expuestos a microfilarias de *Brugia malayi* se observó un decremento de la inducción de RNAm de *T-bet* y *GATA-3*, en contraste hubo un incremento en la expresión de marcadores inmunoreguladores como *Foxp3*, TGF- β , Pd-1, ICOS y CTLA-4, además, se incrementó la producción de ubiquitina ligasa E3, induciendo factores de anergia como *cbl-b*, *c-cbl*, *Itch* y *Nedd4* (Babu y col. 2006). Aunque para el género *Gnathostoma* no es preciso el conocimiento respecto a sus mecanismos inmunomoduladores, posiblemente podría estar estimulando el bloque de receptores de reconocimiento de antígeno y activación de linfocitos durante la infección en hospederos, lo que podría explicar los resultados obtenidos en el presente estudio. Los resultados observados en animales inmunosuprimidos pueden explicarse en dos sentidos: 1) el estímulo antigénico crónico durante la infección podría activar mecanismos de insensibilidad a los corticoides por parte de las estirpes celulares linfocitarias. Se conoce que los súper antígenos de patógenos pueden bloquear los sitios de unión de los receptores de corticoides en células TCD4⁺ y TCD8⁺, y se ha demostrado que la insensibilidad está relacionada con el incremento de la expresión del receptor de glucocorticoides β , que es una isoforma del receptor de glucocorticoides α , que es un potente inhibidor de la acción de los

glucocorticoides. La expresión de este receptor puede ser inducida por el estímulo combinado de IL-4 producida por una respuesta polarizada de tipo Th2 en respuesta a alérgenos e infecciones parasitarias por nematodos e IL-2 que es un estimulador de proliferación de linfocitos (Hauk y col. 2000).

2) el estrés crónico al que los animales silvestres pueden estar expuestos durante el cautiverio o el periodo de adaptación a las condiciones de bioterio pudo haber inhibido el efecto inmunosupresor del fármaco utilizado sobre diferentes estirpes celulares leucocitarias como los linfocitos, ya que se ha documentado que en personas que sufren estrés crónico, la sensibilidad de los linfocitos al efecto de los glucocorticoides se reduce (Bauer et al. 2000), así mismo se ha observado en aves, reptiles y mamíferos como ratones y conejos en cautiverio utilizados con fines de investigación o enseñanza que desarrollan signos de estrés crónico que puede producir desbalance en los niveles de glucocorticoides y por lo tanto una desregulación en la proliferación de células leucocitarias (Estrada y Parra, 2007; Buijjs y col. 2001; Nazar y Marín, 2011; GUA, 2012).

10.7. Conteo diferencial de monocitos en sangre periférica de *D. virginiana* con y sin tratamiento inmunosupresor e infectados con *G. turgidum*

El resultado del porcentaje de monocitos sistémico en cada uno de los grupos reveló que todos los grupos mantuvieron valores similares a excepción del grupo TTI Pre-INMU que mostró diferencias significativas con el resto de los grupos. Sin embargo, después del tratamiento inmunosupresor el porcentaje de monocitos circulantes disminuyó hasta ser similar con el resto de los grupos. De acuerdo con algunos estudios la modulación de la proliferación de monocitos por parte de los parásitos puede contribuir al establecimiento de supervivencia en los tejidos del hospedero. Se ha demostrado que vesículas de excreción de

Schistosoma japonicum que contienen miRNA pueden regular la función de los monocitos periféricos del hospedero facilitando así la supervivencia del parásito. Consistente con esos estudios se ha demostrado que los niveles elevados de monocitos y TNF- α en hospederos, inducen la expresión de genes y la fosforilación de proteínas en *Schistosoma*, lo que coadyuva a su sobrevivencia (Oliveira y col. 2009; Liu y col. 2019), un escenario similar pudiera estarse presentando en la infección por *G. turgidum*.

10.8. Conteo diferencial de basófilos en sangre periférica de *D. virginiana* con y sin tratamiento inmunosupresor e infectados con *G. turgidum*

El porcentaje de basófilos normal durante un conteo diferencial en sangre de tlacuaches se encuentra entre el 0-2 % según la OSUS. Los animales infectados no inmunosuprimidos del presente estudio se determinaron con valores elevado y diferentes estadísticamente al ser comparados con los controles y los grupos inmunosuprimidos. Dependiendo del ciclo de vida de las especies de helmintos, el sistema inmune usa diferentes estrategias para combatir la infección. Algunos gusanos viven como adultos en la luz del intestino para que el sistema inmune intente crear un ambiente que sea inhóspito para el gusano. Otros producen estadios larvarios, huevos o quistes que se encuentran en los tejidos y pueden causar inflamación crónica. Por lo tanto, estos parásitos están protegidos del resto del órgano por la formación de un granuloma que está compuesto de diferentes tipos de células, colágeno y otros componentes de la matriz extracelular. Un tipo de célula efectora que contribuye a la protección contra algunos helmintos son los basófilos (Eberle y Voehringer, 2016).

Durante las infecciones en ratones se sabe que el mecanismo de expulsión de gusanos durante la infección primaria depende de las células T CD4, IL-4 o IL-13 y la expresión del factor de transcripción STAT6 en las células epiteliales gastrointestinales (Finkelman y col,

1997; Urban y col. 1998). IL-4 e IL-13 se unen a receptores similares en la superficie celular de varias células diana y, por lo tanto, activan las células caliciformes en la capa epitelial del intestino delgado, inducen la diferenciación de macrófagos activados alternativamente, aumentan el peristaltismo intestinal mediante la activación de células musculares lisas, promueven la expansión de las células Th2 e inducen la recombinación de cambio de clase IgE en las células B. Las células caliciformes activadas producen moléculas efectoras como Mucin 5ac o Relm- β que promueven la expulsión de gusanos (Herbert y col. 2009; Hasnain y col. 2011). Sin embargo, durante las infecciones primarias, se requieren células innatas productoras de IL-4 / IL 13 en lugar de células T productoras de IL-4 / IL-13 para la expulsión de gusanos (Voehringer y col. 2006; Oeser y col. 2015). La IL-4 / IL-13 innata se expresa principalmente por eosinófilos, basófilos Neill y col. 2010).

Tomando en cuenta lo anterior, el comportamiento de los basófilos observado en los resultados, podría deberse al intento del sistema inmunológico de los tlacuaches para expulsar al parásito o bien al estímulo antigénico que los huevos del parásito producen en el intestino, aunque es necesario tomar en cuenta las características propias de los animales, como la predisposición genética a la infección, el estado nutricional o fisiológico, así como las posibles adaptaciones o hipersensibilidad que podrían haber desarrollado a las condiciones de cautiverio.

10.9. Conteo diferencial de eosinófilos en sangre periférica de *D. virginiana* con y sin tratamiento inmunosupresor e infectados con *G. turgidum*

Como en el caso de los basófilos que participan en la expulsión de parásitos intestinales, se conoce que una de las principales células inmunitarias que participan en la defensa contra helmintos son los eosinófilos y de acuerdo con la OSUS los valores normales se encuentran en

el rango de 2-15 %. En los resultados del presente estudio se observa una clara diferencia estadística entre los grupos infectados TTI NI, TTI pre-INMU y el grupo infectado inmunosuprimido TTI INMU; sin embargo, en el caso de los primeros dos grupos, aunque estaban infectados se mantuvieron dentro del rango propuesto por la OSUS e incluso fueron similares estadísticamente a los controles sanos.

Durante la infección activa por helmintos, la fracción de eosinófilos en la sangre puede aumentar a más del 40% (Gessner y col. 2005). Los eosinófilos tienen proteínas tóxicas específicas de eosinófilos almacenadas en sus gránulos secundarios. Estos incluyen la proteína catiónica de eosinófilos, la peroxidasa de eosinófilos, la neurotoxina derivada de eosinófilos que funcionan como ribonucleasa y la proteína básica principal de eosinófilos que puede provocar liberación de histamina de los mastocitos, contribuyendo a la inflamación (Walash, 2001; Klion y Nutman, 2004). Los estudios experimentales de infección por helmintos revelan que los eosinófilos se acumulan en el tracto gastrointestinal, donde se cree que ayudan a la expulsión de helmintos parásitos (Reimert y col. 2006). Las evidencias sugieren que podría haber diferencias en los mecanismos de muerte mediada por eosinófilos entre las diferentes etapas del ciclo de vida del mismo parásito (Bratting y col. 1991). Por otro lado, los niveles de eosinófilos dentro de los rangos normales mostrados por los grupos de tlacuaches no inmunosuprimidos podrían deberse a mecanismos de inmunomodulación por parte de *G. turgidum*, que pueden estar siendo activados por moléculas de excreción secreción que disminuyen el reclutamiento de eosinófilos en infecciones por helmintos. Las evidencias sugieren que parásitos como las filarias suprimen las respuestas inmunitarias del tipo alérgico donde se involucran eosinófilos, como se ha demostrado durante la implantación en la cavidad peritoneal de *Litomosoides sigmodontis* (Dittrich y col. 2008). Así mismo, en infecciones con

Nippostrongylus brasiliensis también bloquea el reclutamiento de eosinófilos en pulmón de manera dependiente de IL-10 mediante la secreción de proteasas que degradan eotaxina (Culley y col. 2000; Wohlleben y col. 2004), *N. brasiliensis* suprime potentemente también la infiltración de eosinófilos, citosinas Th2 y el desarrollo de patología histológica (Montes y col. 2009). Con los resultados obtenidos en esta investigación, se sugiere que, en los animales del grupo sometido a inmunosupresión con Prednisona, el corticoide pudo actuar de manera específica sobre los eosinófilos regulando su proliferación y reclutamiento durante la infección de *D. virginiana* con *G. turgidum*. En este trabajo se realizó la evaluación histopatológica del daño causado por el parásito en hígados y estómagos de los grupos infectados inmunosuprimidos y no inmunosuprimidos, dónde se esperaba encontrar eosinófilos en el sitio de la infección, sin embargo, contrario a lo esperado las células predominantes en el tejido infectado fueron neutrófilos como se incluye en la descripción histopatológica a continuación.

10.10. Evaluación del daño histopatológico causado por *G. turgidum* en *D. virginiana*

La evaluación de los daños histológicos mostró características similares entre los grupos TTI Ni y TTI INMU tanto en hígado como en estómago. Las alteraciones histopatológicas en tejido hepático de ambos grupos fueron focos necróticos, hemorragias, abundante infiltrado inflamatorio principalmente conformado por polimorfonucleares neutrófilos y un marcado cuadro de fibrosis hepática. Los cambios patológicos descritos en el presente estudio coinciden con lo reportado en previos estudios donde se les dio seguimiento a los cambios histopatológicos que *G. turgidum* causa en tejido hepático y estomacal de *D. virginiana* durante el periodo de duración del ciclo de infección (Torres-Montoya y col. 2017). El infiltrado de células inflamatorias es un proceso normal en infecciones, incluyendo las que afectan e implican daño crónico a los tejidos; la inflamación crónica es sostenida por la

infiltración de células del sistema inmune del hospedero tales como neutrófilos, eosinófilos, macrófagos activados y linfocitos T. estas células participan tanto en el daño como en la reparación del tejido, sin embargo, durante las inflamaciones crónicas pueden ocurrir miopatías que pueden ser causadas por diferentes razones, por ejemplo, el sistema inmune del hospedero puede actuar contra sí mismo y dañar el tejido en una respuesta autoinmune (Lundberg y Chung, 1998) o bien puede ser el resultado de una reacción alérgica o exposición constante a xenobioticos o drogas e incluso a infecciones por virus, bacterias o parásitos (Bruschi y Chiumiento, 2011), como es el caso de los resultados de la presente investigación que incluye la exposición prolongada a parásitos y tratamiento inmunosupresor farmacológico. A pesar de ello es necesario estudiar los mecanismos y razones por las que la inflamación in situ en los tejidos de *D. virginiana* infectados con *G. turgidum* la inflamación es mediada predominantemente por neutrófilos, ya que se ha demostrado que en infecciones por nematodos como *Trichinella* la respuesta es inflamatoria es diferente dependiendo de la especie que se trate (Bruschi y col. 2009). Por otra parte, los procesos de fibrosis también han sido descritos en infecciones de *Fasciola hepatica* en hígado de ganado, donde se describe que en al menos 2 terceras partes del tejido hepático se puede observar fibrosis, además se ha sugerido que el grado de fibrosis hepática está correlacionado con la carga parasitaria, es decir, el avance, establecimiento e incluso la reversibilidad parcial de la fibrosis está ligado al número de parásitos y daño causado en el hígado de ganado infectado (Marcos y col 2007). Respecto a la fibrosis hepática es considerada una respuesta para la cicatrización, que tiene el propósito de limitar el daño tisular producido por lesiones hepáticas crónicas, pero cuando el daño es persistente, este proceso de cicatrización puede producir alteración de la arquitectura hepática por la aparición de cirrosis, que se caracteriza por bandas de fibras de colágenas, nódulos parenquimatosos de regeneración y distorsión vascular.

En el proceso fibrótico intervienen principalmente 3 tipos de células hepáticas: los hepatocitos, células de Küpffer y las células estelares hepáticas. La activación de las células estelares hepáticas puede ser el resultado de la interacción de los diferentes tipos celulares hepáticos: los macrófagos activados (células de Küpffer), los hepatocitos dañados o lesionados, las plaquetas y las células endoteliales, con la consiguiente producción y liberación de diferentes citosinas y especies reactivas de oxígeno (Páramo Hernández y col. 2010). La mayor producción y actividad de las citoquinas es crítica para perpetuar la activación de las células estelares hepáticas. La matriz extracelular constituye también un reservorio importante de factores de crecimiento, incluidos el factor de crecimiento tumoral beta (TGF β), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y el factor activador de plaquetas (PAF). Finalmente, las células estelares hepáticas liberan también quimioatrayentes capaces de amplificar la inflamación en la lesión hepática, como el factor estimulante de colonias (CSF), la proteína quimiotáctica monocitaria 1 (MCP-1), la IL-6 y el quimioatrayente neutrofílico inducido por citosinas/IL-8 (CINC). (Vera & Nieto, 2006).

En el tejido estomacal de los grupos de tlacuaches infectados se observaron cambios patológicos similares, los resultados coinciden con lo descrito por Torres-Montoya y col. 2017. Así mismo, se han observado daños similares en murciélagos infectados con *Physaloptera brevivaginata*, en abejas infectadas con *Haeomonchus contortus* y en gatos silvestres *Otocolobus manul* infectados con *Spirocerca lupi*, donde los daños causados en el estómago incluían nódulos granulomatosos, destrucción de la mucosa, necrosis, infiltración de

celulas inflamatorias y aparente fibrosis (Botela y Esteban, 1995; Tehrani y col. 2012; Hosseini y col. 2019).

Aunque los daños histopatologicos fueron similares en ambos grupos, existieron diferencias en cuanto a la gravedad del daño causado por el parasito, siendo el grupo TTI INMU el más afectado desde el punto de vista patológico, ya que mostro daño tisular más severo, con más zonas necrticas y estructuras de tipo cuerpo extraño, así como infiltrado inflamatorio predominantemente compuesto por neutrofilos. Como se explico en los apartados anteriores relacionados con el conteo de celulas leucocitarias, las diferencias en el daño tisular causado por *G. turgidum* pudieron deberse a diferentes factores; por ejemplo el efecto que el inmunosupresor pudo haber tenido sobre celulas leucocitarias de estirpes especificas, el propio mecanismo inmunomodulador de se conoce que los helmintos ejercen sobre hospedero y que explicarian el por qué el infiltrado inflamatorio observado *in situ* en la lesión era predominantemente de neutrofilos cuando se esperaba una abundancia considerable de eosinofilos. En ese sentido, con base en los resultados del conteo de linfocitos en animales infectados inmunosuprimidos se esperaba observar mayor nuemro de estas celalas en la zona de la lesión, sin embargo el infiltrado linfocitario fue escaso.

Debe tomarse en cuenta tambien factores propios del hospedero que pudieron haber influido en el desarrollo de la patología, como el estrés por cautiverio, el estdo nutricio del animal, la intensidad de la carga parasitaria, el sexo, edad, talla e incluso constitución genetica de cada animal, todas variables que al ser animales extraidos de vida silvestre no se pueden controlar.

Los resultados del presente trabajo sugieren, que el ciclo de vida de *G. turgidum* en Sinaloa incluye copepodos de la especie *M. edax* como primeros hospederos intermediarios,

que los segundo hospederos intermediarios en vida silvestre probablemente no son anfibios del genero *Rana* (*Lithobates*), al menos en la zona de distribución del parasito en el estado; sin embargo, es necesario realizar investigaciones para esclarecer los mecanismos que *Gnathostoma* podría utilizar para la selección de hospedero especie-especifica. Por ultimo, la respuesta inmunologica mas importante de *D. virginiana* durante la infección con *G. turgidum* podría estar siendo mediada principalmente por neutrofilos y eosinofilos, aunque más estudios son necesarios para esclarecer el mecanismo especifico por el cual estas celulas participan en la defensa y posible expulsión de los parásitos.

XI. CONCLUSIONES

11.1. Conclusión general

Didelphis virginiana es un buen hospedero para el desarrollo de un modelo *in vivo* para el estudio del ciclo de vida de *Gnathostoma* y de los mecanismos patogénicos de la gnathostomosis.

11.1.1. Conclusiones específicas

Se identificó la especie de copépodo *Mesocyclops edax* como primer hospedero intermediario de *Gnathostoma turgidum* en el estado de Sinaloa y las especies de anfibios que se distribuyen de forma natural en el estado de Sinaloa, podrían no ser hospederos intermediarios del ciclo de *Gnathostoma* en Sinaloa.

Las estirpes leucocitarias que participan de manera más importante en la respuesta inmunológica de *D. virginiana* contra *G. turgidum* son neutrófilos y linfocitos.

El daño histopatológico causado por *G. turgidum* en hígado y estómago de *D. virginiana* se exagera en animales sometidos a inmunosupresión.

XII. LIMITACIONES DEL PROYECTO

1. La adaptabilidad de *D. virginiana* al cautiverio, debido a que durante el periodo que este proyecto duró, se tuvieron que hacer recapturas de especímenes, por la muerte sin causa patológica aparte.
2. La nula disponibilidad de kits e insumos comerciales específicos diseñados para marsupiales. Se probaron anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos a inmunotipificar la respuesta celular inmunitaria de *D. virginiana* contra *G. turgidum*. Sin embargo, no funcionaron por lo que la especificidad y profundidad de los resultados no pudo avanzar más allá de lo obtenido en este estudio.
3. Debido a la estacionalidad del parásito, el tiempo de captura de animales para realizar la obtención de material biológico para el estudio se reducía a solo 5 meses por año. Y al no haber un modelo base establecido para la reproducción del ciclo de vida en condiciones de laboratorio, esto podía llegar a dificultar la obtención de resultados.

XIII. BIBLIOGRAFÍA.

Abo-Aziza, F. A. M., Hendawy, S.H. M., El Namaky, A. H., Ashry H. M. (2017). Th1/Th2 balance and humoral immune response to potential antigens as early diagnostic method of equine *Strongylus* nematode infection. *Veterinary World*. 10:679-687.

Abreu Morales, F, Fidalgo Álvarez, L. (2003). *Patología médica veterinaria: libro de texto para la docencia de la asignatur*. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela. 616 p. ISBN 849773-046-1.

Almeyda-Artigas, R, Mosqueda-Cabrera, M, Sánchez-Nuñez, E, Saldaña-Martínez, G, Hernandez-Viciconti, M, Alcolea-Herrera, E. (1995). Development of *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991 (Nematoda: Gnathostomatidae) in first intermediate experimental host. *Research and Reviws in Parasitology*. 55 (3), 189-194.

Álvarez-Guerrero, C, Muñoz-Guzmán, M, Alba-Hurtado, F. (2012). Clinical and diagnosis aspects of experimental canine gnathostomosis. *Veterinaria de México*, 43(1), 17-27.

Álvarez-Guerrero, C, Muñoz-Guzmán, M, Alba-Hurtado, F. (2014). Patological and parasitological traits in experimentally infected cats with *Gnathostoma binucleatum* (Spirurida: Gnathostomatidae). *Veterinary Parasitology*. 204, 279-284.

Álvarez-Guerrero, C, Muñoz-Guzmán, M, Buendía-Jiménez, J, Alba-Hurtado, F. (2011). *Gnathostoma binucleatum*: Pathological and parasitological aspects in experimentally infected dogs. *Experimental Parasitology*, 127 (1), 84-89.

Amarante, A. F. T. Amarante, M. R. V. (2016). Advances in the diagnosis of the gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 53:127-137.

Anantaphruti, M, Dekumyoy, P. (2005). Diagnostic values of IgG4 in human gnathostomosis. *Tropical Medicine and International Health*. 10(10), 1013-1021.

Babu, S., Blauvelt, C.P., Kumaraswami, V., Nutman, T.B. (2006). Regulatory networks induced by live parasites impair both Th1 and Th2 pathways in patent lymphatic filariasis: implications for parasite persistence. *Journal of Immunology*. 176: 3248–3256.

Bauer, M. E., Vedhara, K., Perks, P., Wilcock, G. K., Stafford, L. L., Shanks, N. (2000). Chronic stress in caregivers of dementia patients is associated with reduced lymphocyte sensitivity to glucocorticoids. *Journal of Neuroimmunology*. 103: 84-92.

Belina, D., Abdurahman, G., Mengistu, S., Eshetu, A. (2017). Gastrointestinal nematodes in ruminants: the parasite burden, associated risk factors and anthelmintic utilization practice in selected district of east and western Hararghe, Ethiopia. *Journal of Veterinary Science and Technology*. 8:433-440.

Benesh, D, Chubb, J, Parker, G. (2011). Exploitation of the same trophic links favors convergence of larval life-history strategies in complex life cycle helminths. *Evolution*. 65, 2286-2299.

Benesh, D. (2016). Autonomy and integration in complex parasite life cycles. *Parasitology*. 143, 1824-1846.

Bertoni-Ruiz, F, Garcia-Prieto, L, Osorio-Sarabia, D. (2005). A new species of *Gnathostoma* (Nematoda: Gnathostomatidae) in *Procyon lotor hernandezii* de México. *The Journal of Parasitology*. 91(5), 1143-1149.

Bertoni-Ruiz, F, Lamothe-Argumedo, M, Osorio-Sarabia, D, León-Régagnon, V. (2011). Systematics of the genus *Gnathostoma* (Nematoda: Gnathostomatidae) in the Americas. *Revista Mexicana de Biodiversidad*.82, 453-464.

Biochem, J. C. (1983). IFCC method for the measurement of ALP. *21*, 731-48.

Biochem, J. C. (1986). IFCC Expert Panel on enzymes Part 3. *24*, 481-95.

Biochem, J. C. (1986). IFCC Method for L-Aspartate Aminotransferase. *24*, 497-510.

Botella, O., Esteban, J. G. (1995). Histopathology of the stomach lesión caused by *Physaloptera brevivaginata* (Nematoda. Physalopteridae) in bats in Spain. *Folia Parasitologica*. 42:143-148.

Brattig, N. W., Tischendorf, F. W., Strote, G., Medina-De La Garza, C. E. (1991). Eosinophil-larval-interaction in onchocerciasis: heterogeneity of in vitro adherence of eosinophils to infective third and fourth stage larvae and microfilariae of *Onchocerca volvulus*. *Parasite Immunology*. 13:13–22. doi:10.1111/j.1365-3024.1991.tb00259.x

Bruschi, F., Marucci, G., Pozio, E., Massetti, M. (2009). Evaluation of inflammatory responses against muscle larvae of different *Trichinella* species by an image analysis system. *Veterinary Parasitology*. 159: 258-262.

Bruschi, F., Chiumiento, L- (2011). *Trichinella* inflammatory myopathy: host or parasite strategy. *Parasites & Vectors*. 4: doi: 10.1186/1756-3305-4-42

Buijs, S., Keeling, L. J., Rettenbacher, S., Maertens, L., Tuytens, F. A. M. (2011). Glucocorticoid metabolites in rabbits faces-influence of environmental enrichment and cage size. *Physiology & Behavior*. 104;469-473.

Buys, J., Wever, R., Ruitenber, E.J. (1984). Myeloperoxidase is more efficient than eosinophil peroxidase in the in vitro killing of newborn larvae of *Trichinella spiralis*. *Immunology*. 51:601-7.

Combes, C. (2001). Parasitism. The ecology and evolution of intimate interaction. The University of Chicago Press. P728.

Culley, F. J., Brown, A., Conroy, D. M., Sabroe, I., Pritchard D. I., Williams, T. J. (2000). Eotaxin is specifically cleaved by Hookwormmetaloproteases preventing its action *in vitro* and *in vivo*. *The Journal of Immunology*. 165:6447-6453.

Cuz Aubry, J. (2002). Zoonosis en la republica mexicana. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 10(4), 206-208.

Díaz Camacho, S P, Willms, K, De la Cruz-Otero, M, Zazueta-Ramos, M L, Bayliss-Gaziola, S, Castro-Velázquez, R, Osuna-Ramírez, I, Bojórquez-Contreras, A, Torres-Montoya, E H, Sánchez-González, S. (2003). Acute outbreak of gnathostomiasis in a fishing community in Sinaloa, Mexico. *Parasitology International*. 52, 133-140.

Díaz- Camacho, S P, Willms, K, Rendón-Maldonado, J G, De la Cruz-Otero, M., Robert, L, Antuna, S, León-Règagnon, V, Nawa, Y. (2009). Discovery of an Endemic Area of *Gnathostoma turgidum* Infection among opossums, *Didelphis virginiana*, in Mexico. *Journal of Parasitology*, 95(3), 617-622.

Díaz Camacho, S., de la Cruz Otero, M., & K., W. M. (2000). Gnathostomosis. *Revista de la Facultad de Medicina (UNAM)*, 43(5), 192-201.

Díaz, J H. (2015). Gnathostomiasis: An Emerging infection of Raw Fish Consumers in *Gnathostoma* Nematode-Endemic and Nonendemic Countries. *Journal of Travel Medicine*. 22 (5), 318-324.

Díaz-Camacho, S P, De la Cruz-Otero, M, Torres-Montoya, E H, Sánchez-González, S, Delgado-Vargas, F, Nawa, Y. (2010 (a)). Infection status of the estuarine turtles *Kinosternon integrum* and *Trachemys scripta* with *Gnathostoma binucleatum* in Sinaloa. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 81(2), 569-571.

Díaz-Camacho, S P, Delgado-Vargas, F, Willms, K, De la Cruz-Otero, M, Rendón-Maldonado, J G, Robert, L, Antuna, S, Nawa, Y. (2010). Intrahepatic growth and maturation of *Gnathostoma turgidum* in the natural definitive opossum host, *Didelphis virginiana*. *Parasitology International*. 59, 338-343.

Díaz-Camacho, S P, Zazueta-Ramos, M, Ponce-Torrecillas, E, Osuna-Ramírez, I, Castro-Velázquez, R, Flores-Gaxiola, A, Baquera-Heredia, J, Willms, K, Akahane, H, Ogata, K, Nawa, Y. (1998). Clinical manifestations and immunodiagnosis of Gnathostomiasis in Culiacan, México. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 59 (6), 908-915.

Dittrich, A. M., Erbacher, A., Specht, S., Diesner, F., Krokowski, M., Avagyan, A., Stock, P., Ahrens, B., Hoffman, W. H., Hoerauf, A., Hamelman, E. (2008). Helminth infection with *Litomosoides sigmodontis* induces regulatory T cells and Inhibits allergic sensitization, airway inflammation, and hiperreactivity in a murine asthma model. *The Journal of Immunology*. 180: 1792-1799.

Eber., J., U., Voehringer, D. Role of basophils in protective immunity to parasitic infections. *Seminars in Immunopathology*. DOI 10.1007/s00281-016-0563-3

Edna, B, Prophet, B M, Arrington, J B, Sobin, L H, Castellano, M, Heffess, C S. (1992). metodos histotecnológicos. *Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América*.

Edna, B, Prophet, B M, Leslie, H S, Castellano, M, Florabel, G & Mullick, M. (1992). Métodos histotecnológicos. *Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de America*.

Estrada, G. E., Parra, J. P. (2007). Enriquecimiento ambiental de fauna silvestre sometida a cautiverio en el hogar de paso UNIAMAZONIA-CORPOAMAZONIA. *Resvista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 2:8-13.

Finkelman, F. D., Shea-Donohue, T., Goldhill, J., Sullivan, C. A., Morris, S.C., Madden, K.B., Gause, W.C., Urban, J.F. Jr. (1997). Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annual Review of Immunology*. 15:505–533

Freudenstein-Dan, A., Gold, D., Fishelson, Z. (2003). Killing of schistosomes by elastase and hydrogen peroxide: implications for leukocyte-mediated schistosome killing. *Journal of Parasitology*. 89:1129–35. doi:10.1645/GE-96R

Galaviz-Rentería, X. (2012). Identificación taxonómica de copépodos involucrados en el ciclo biológico de *Gnathostoma turgidum* presentes en un area endémica de Gnathostomosis en Sinaloa. *Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, UAS, Sinaloa, Mexico*.

García-Márquez, L., León-Règagnon, V., Lamothe-Argumedo, R., Osorio-Sarabia, D., García-Prieto, L. (2014). Inflammatory response caused by larvae and adults of *Gnathotoma* (Nematoda: Gnathostomatidae) in vertebrates of Mexico, including humans. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 85, 429-435.

García-Márquez, L. (2005). Estudio de la gnathostomiasis en el estado de Colima, México. *Tesis doctoral, Facultad de medicina veterinaria y zootecnia, Universidad de Colima. Tecoman, Colima, México.*

Gaspar-Navarro, J., Almeida-Artigas, R., Sanchez-Miranda, E., Carranza-Calderon, L., Mosqueda-Cabrera, M. (2013). Description of advanced third-stage larvae of *Gnathostoma lamotthei* Bertoni-Ruiz 2005 (Nematoda: Gnathostomidae) from experimental hosts and contributions to its life cycle. *Parasitology Research*. 112, 169-175.

Gessner, A., Mohrs, K., Mohrs, M. (2005). Mast cells, basophils, and eosinophils acquire constitutive IL-4 and IL-13 transcripts during lineage differentiation that are sufficient for rapid cytokine production. *Journal of Immunology*. 174: 1063–72. doi: 10.4049 / jimmunol.174.2.1063

González-Garduño, R., Arellano, M. E. L., Mendoza de Gives, P., García, J. A., Magdeline, C. M., Hrenández, G. T., Hernández, J. O., Hinojosa-Cuéllar, J. A. (2017). Comparative response of IgA and IgG activity and hematological parameters among four main beef-cattle breeds infected with gastrointestinal nematodes in the warm humid tropic of Mexico. *Annals of Animal Science*. 17: 819-833.

Graeff -Taexeira, C, Arámburu de Silva, A, Yoshimura, K. (2009). Update on Eosinophilic Meningoencephalitis and its Clinical Relevance. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(2), 322-348.

Guidelines for the Use of Animals. (2012). Guidelines for the treatment of animals in behavioural research and teaching. *Animal Behaviour*. 83:301-309.

Hasnain, S. Z., Evans, C. M., Roy, M., Gallagher, A. L., Kindrachuk, K. N., Barron, L., Dickey, B. F., Wilson, M. S., Wynn, T. A., Grencis, R. K., Thornton, D. J. (2011). Muc5ac: a critical component mediating the rejection of enteric nematodes. *Journal of Experimental Medicine*. 208:893–900

Hauk, P. J., Hamid, Q. A., Chrousos, G. P., Leung, D. Y. M. (2000). Induction of corticosteroids insensitivity in human PBMCs by microbial superantigens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 105:782-787.

Herbert, D. R., Yang, J. Q., Hogan, S. P., Groschwitz, K., Khodoun, M., Munitz, A., Orekov, T., Perkins, C., Wang, Q., Brombacher, F., Urban, J. F. Jr., Rothenberg, M. E., Finkelman, F. D. (2009). Intestinal epithelial cell secretion of RELM-beta protects against gastrointestinal worm infection. *The Journal of Experimental Medicine*. 206:2947–2957

Herbert, D.R., Nolan, T.J., Schad, G.A., Abraham, D. (2002). The role of B cells in immunity against larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *Parasite Immunology*. 24: 95-101. doi: 10.1046/j.0141-9838.2001.00441.x

Herman, J S, Wall, E C, van Tulleken, C., Godfrey-Fausset, P, Bailey, R L, Chiodini, P L. (2009). Gnathostomiasis Acquired by British tourist in Botswana. *Emerging Infectious Diseases*. 15(4), 594-597.

Hosseini, S. M., Ronaghi, H., Moshrefi, A. M., Zaheri, B. A., Adibi, M. A., Tavassoli, K. (2019). Histopathological study of gastric infection with *Spirocerca lupi* in Palla's cat (*Otocolobus manul*). *Comparative Clinical Pathology*. 28: 943-947.

Janwan, P, Intapan, P M, Sanpool, O, Sadaow, L, Thanchomnang, T, Maleewong, W. (2011). Growth and development of *Gnathostoma sipinigerum* (Nematoda: Gnathostomatidae) larvae in *Mesocyclops aspericornis* (Cyclopoida: Cyclopidae). *Parasites and Vector*. 4 (93).

Jiménez, P, & Alva, . (2009). Infección por *Gnathostoma* (Spurida: Gnathostomidae) en *Hoplias microlepis*: prevalencia, correlación con la talla del pez, hésped e implicaciones para salud pública en Ecuador. *Biomédica*.29, 591-603.

Jong, E.C., Mahmoud, A.A., Klebanoff, S.J. (1981). Peroxidase-mediated toxicity to schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Immunology*. 126:468–71.

Kandil, O. M., Abdelrahman, K. A., Shalaby, H. A., Hendawy, S. H. M., Abu El Ezz N. M. T., Nassar, S. A., Miller, J. E. (2017). Evaluation of crude larval protein 23/26 (rHcp26/23) immunization against *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary World*. 10:758-763.

Klion, A. D., Nutman, T. B. (2004). The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. *Journal of Allergy Clinical Immunology*. 113:30–7. doi:10.1016/j.jaci.2003.10.050

Lamothe-Argumedo, R, Akahane, H, Osorio-Sarabia, D, García Prieto, L. (1998). Hallazgo de *Gnathostoma turgidum* en *Didelphis virginiana* de temascal, Oaxaca, Mexico. *Anales Instituto de Biología (UNAM)*.69(2), 225-229.

Lamothe-Argumedo, R. (2003). La gnathostomosis en México: un problema de salud pública. *Anales del Instituto de Biología (UNAM)*. 7(001), 99-103.

Lamothe-Argumedo, R. (2005). Gnathostomosis ocular en México. *Revista Mexicana de Oftalmología*. 72(2), 118-120.

Liu, J., Zhu, L., Wang, J., Qiu, L., Chen, Y., Davis, R. E., Cheng, G. (2019). Schistosoma japonicum extracellular vesicle miRNA cargo regulates host macrophage functions facilitating parasitism. PLOS Pathogens. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007817>

Lundberg, I., Chung, Y. (2011). Treatment and investigation of idiopathic inflammatory myopathies. *Rheumatology*. 39: 7-17.

Marcos, L. A., Yi, P., Machicado, A., Andrade, R., Smalvides, F., Sanchez, J., Terashima, A (2007). Hepatic fibrosis and *Fasciola hepatica* infection in cattle. *Journal of Helminthology*, 81, 381-386.

McRae, K. M., Stear, M. J., Good, B., Keane, O. M. (2015). The host immune response to gastrointestinal nematode infection in sheep. *Parasite Immunology*. 37: 605-6013. DOI: 10.1111/pim.12290

Ming Li, D, Rong Chen, X, Song Zhou, J, Biao Xu, Z, & Nawa, Y. D. (2009). Short Report: Case of Gnathostomiasis in Beijing, China. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*.80(2), 185-187.

Mosqueda-Cabrera, M, Almeyda-Artigas, R, Sánchez-Miranda, E, Carranza-Calderon, L, Sánchez-Nuñez, E. (2010). Description and development of the early third-stage larva of *Gnathostoma turgidum* Stossich, 1992 (Nematoda: Gnathostomatidae) and contribution to its life cycle. *Parasitol Research*. 106, 1321-1326.

Nawa, Y, De la Cruz-otero, M, Zazueta-Ramos, M L, Bojórquez-Contreras, A, Josefina, S F, Campista-León, S. (2009). Is *Gnathostoma turgidum* an Annual Parasite of Opossum? Drastic Seasonal Changues of Infection in *Didelphis virginiana* in México. *Journal of Parasitology*.95(4), 908-912.

Nawa, Y, Nakamura, F. (2004). An overview of gnathostomiasis in the world. *Korean Journal of Parasitology*.31, 87-91.

Nazar, F. N., Marín, R. H. (2011). Efecto del estres y del enriquecimiento ambiental temprano sobre parámetros de inmunidad celular de codornices japonesas juveniles. *Resvista Argentina de Producción Animal*. 31: 63-69.

Neill, D. R., Wong, S. H., Bellosi, A., Flynn, R. J., Daly, M., Langford, T. K., Bucks, C., Kane, C. M., Fallon, P. G., Pannell, R., Jolin, H. E., McKenzie, A. N. (2010). Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature*. 464:1367–1370.

O’Connell, A.E., Hess, J.A., Santiago, G.A., Nolan, T.J., Lok, J.B., Lee, J.J., Abraham, D. (2011). Major basic protein from eosinophils and myeloperoxidase from neutrophils are required for protective immunity to *Strongyloides stercoralis* in mice. *Infection and Immunity*. 79:2770–8. doi:10.1128/IAI.00931-10

Oeser, K., Schwartz, C., Voehringer, D. (2015). Conditional IL-4/IL-13- deficient mice reveal a critical role of innate immune cells for protective immunity against gastrointestinal helminths. *Mucosal Immunology*. 8:672–682.

Oliveira, K. C., Carvalho, M. L., Venancio, T. M., Niyasato, P. A., Kewano, T., DeMarco, R. Verjovski-Almeida, S. (2009). Identification of the *Schistosoma mansoni* TNF-

alpha receptor gene and the effect of human TNF-alpha on the parasite gene expression profile. PLoS Negl Trop Dis 3: e556. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000556>

Oppenheim, J.J., Yang, D. (2005) Alarmins: activadores quimiotáticos de las respuestas inmunes. Current Opinion in Immunology. 17: 359–65. doi: 10.1016 / j.coi.2005.06.002

Páramo Hernández, D. B., Otero Regino, W., & Pineda Ovalle, L. F. (2010). Hepatic fibrogenesis. Revista Colombiana de Gastroenterología, 25(2), 187-197.

Pérez-Álvarez, Y, García-Prieto, L, Osorio-Sarabia, D, Lamothe-Argumedo, R, León-Régagnon, V. (2008). Present distribution of the genus *Gnathostoma* (Nematoda: Gnathostomatidae) in México. *Zootaxa*, 39-55.

Pernthaner, A., Stankiewicz, M., Bisset, S. A., Jonas, W. E., Cabaj, W., Pulford, H. D. (1995). The immune responsiveness of Romney sheep selected for resistance or susceptibility to gastrointestinal nematodes: Lymphocyte blastogenic activity, eosinophilia and total white blood cell counts. International Journal for Parasitology. 25(4): 523-529.

Ramirez-Avila, L, Salome, S, Schuster, F L, Gavili, S M, Schantz, P, Sejvar, J A, Glaser, C. (2009). Eosinophilic Meningitis due to *Angiostrongylus* and *Gnathostoma* Species. *Emerging Infections*. 48, 322-327.

Reid, W J, Moreno, L. (1999). The western and southern distribution of *Mesocyclops edax* (S. A. Forbes) (Crustacea: Copepoda: Cyclopodia). Proceeding of the biological society of Washington. 112 (3), 581-591.

Reimert, C. M., Fitzsimmons, C. M., Joseph, S., Mwatha, J. K., Jones, F. M., Kimani, G., Hoffman, K. F., Booth, M., Dunne, D. W., Vennervald, B. J. (2006). Eosinophil activity in *Schistosoma mansoni* infections in vivo and in vitro in relation to plasma cytokine profile

pre- and posttreatment with praziquantel. *Clinical and Vaccine Immunology*. 13:584–93.
doi:10.1128/CVI.13.5.584-593.2006

Ripoli Martín, R. (2006). Cuantificación En Tiempo Real De La Subunidad Htert (Telomerase Reverse Transcriptase) Del Gen De La Telomerasa En Plasma De Pacientes Con Cáncer Colorrectal. *Tesis Doctoral, Universitat de Valencia*, 1-184.

Roa-Higuera, D, Fiorentino, S, Rodríguez-Pardo, V, Campos-Arenas, A, Infante-Acosta, E, Cardozo-Romero, C, Quijano-Gómez, S. (2010). Análisis inmunofenotípico de muestras normales de médula ósea: aplicaciones en el control de calidad en los laboratorios de citometría. *Universitas Scientiarum*. 15 (3), 206-223.

Rodríguez-Diego J G, Pedroso-Reyes M, Olivares JL, Sánchez-Castilleja Y M, Arce-García J. (2014). La interacción hospedero-parásito. Una visión evolutiva. *Revista de Salud Animal*. 36(1), 1-6.

Rojas-Molina, N, Pedraza-Sanchez, S, Torres-Bibiano, B, Meza-Martinez, H & Escobar-Gutierrez, A. (1999). Gnathostomosis, an Emerging Foodborne Zoonotic Disease in Acapulco, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*.5(2), 264-266.

Saksirisampant, W, Choomchuay, N, Kraivichian, K, Wongtayanon-Thanomsub, B. (2012). Larva Migration and Eosinophilia in Mice Experimentally Infected with *Gnathostoma spinigerum*. *Iranian Journal of Parasitology*. 7(3), 73-81.

Sen R, Nayak L, De RK. (2016). A review on host-pathogen interactions: classification and prediction. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease*. 35, 15281-1599.

Suárez-Morales, E. (2000). Copépodos, seres ubicuos y poco conocidos. *CONABIO.Biodiversitas*, 29, 7-11.

Sukotanson, K., Sukotanson, K. L., Muangyimpong, Y., Somsak, P. (2001). Experimental infection of *Gnathostoma spinigerum* larvae in prawns and tadpoles. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 32(2): 122-125.

Tehrani, A., Javanbakht, J., Jani, M., Sasani, F., Solati, A., Rajabian, M., Khadivar, F., Akbari, H., Mohammadian, M. (2012). Histopathological study of *Haemonchus contortus* in Herrik sheep abomasum. *Journal of Bacteriology and Parasitology*. 3: DOI: 10.4172/2155-9597.1000144

Torres-Montoya, E, Galaviz Rentería, X, Castillo Ureta, H, Lopez Moreno, H, Nawa, Y, Bojorquez Contreras, A, Sanchez-Gonzales, S, Díaz-Camacho, S, Rocha-Tirado, R, Rendón-Maldonado, J. (2014). Spontaneous cure after natural infection of *Gnathostoma turgidum* (Nematoda) in Virginia opossum, *Didelphis virginiana*. *Journal of Wildlife Disease*.50(02).

Tranchida, M, Micieli, M, Maciá, A, García, J. (2009). Native Argentinean cyclopoids (Crustacea: Copepoda) as predators of *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. 57(4), 1059-1068.

Trujillo-Vargas, C. M., Werner-Klein, M., Wohlleben, G., Polte, T., Hansen, G., Ehlers, S., Erb, J. J. (2006). Helminth-derived products inhibit the development of allergic responses in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Medicine*. 175:336-344.

Urban, J. F. Jr., Noben-Trauth, N., Donaldson, D. D., Madden, K. B., Morris, S. C., Collins, M., Finkelman, F. D. (1998). IL-13, IL-4, and Stat6 are required for the

expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunity*. 8:255–264

Vázquez-Tsuji, O, Campos-Rivera, T, Rodán-Zárate, A. (2006). Gnathostomosis humana, abordaje, diagnóstico y tratamiento. *Revista del Centro de Investigación. Universidad La Salle*.7(25), 65-76.

Vera, M., Nieto, N. (2006). Células estelares hepáticas y hepatopatía alcohólica. *Revista Española de Enfermedades y Diagnóstico*, 98(9), 674-684.

Voehringer, D., Reese, T. A., Huang, X., Shinkai, K., Locksley, R. M. (2006). Type 2 immunity is controlled by IL-4/IL-13 expression in hematopoietic non-eosinophil cells of the innate immune system. *The Journal of Experimental Medicine*. 203:1435–1446

Walberg, J. 2001. White blood cell counting techniques in birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 10: 72-76.

Walsh, G. M. (2001). Eosinophil granule proteins and their role in disease. *Current Opinion Hematology*. 8:28–33. doi:10.1097/00062752-200101000-00006

Watanabe, K., Noda, K., Hamano, S., Koga, M., Kishihara, K., Nomoto, K., Tada, I. (2000). The crucial role of granulocytes in the early host defense against *Strongyloides ratti* infection in mice. *Parasitology Research*. 86: 188–93. doi: 10.1007 / s004360050030

Williamson, C. (1986). Cladoceran body size and vulnerability to copepod predation. *Limnology and oceanography*. 39 (2), 419-424.

XIV. ANEXOS

11.1. Perspectivas

11.1.1. Complementar el estudio de los posibles segundos hospederos intermediarios de *Gnathostoma turgidum* en Sinaloa.

11.1.2. Estudiar los factores que determinan la selectividad de hospedero por parte de *G. turgidum*.

11.1.3. Comprobar la infección de *M. edax* con *G. turgidum* en vida silvestre.

11.1.4. Evaluar el efecto de las enzimas y proteínas de neutrófilos y eosinófilos aislados de *D. virginiana* pueden tener sobre larvas de *G. turgidum* y *G. binucleatum*, como posible agente terapéutico de gnathostomosis.

11.2. Productos

Artículo publicado en la revista Journal of Helminthology

Journal of Helminthology

cambridge.org/jhl

Short Communication

Diehl, M. A., Montoya, E. H., Zazuata-Morino, J. M., Castillo-Ureta, G., Silva-Hidalgo, G., López-Morino, H.S., Osuna-Ramírez, I., Noguera-Corona, E., Rendón-Maldonado, J. G. Histopathological changes in the liver and stomach of *Didelphis virginiana* (Didelphimorphia: Didelphidae) during natural infection with *Gnathostoma turgidum* (Nematoda: Gnathostomidae). *Journal of Helminthology* (https://doi.org/10.1017/S0022268920000800)

Received: 26 July 2021
Accepted: 13 September 2021

Author for correspondence:
J.G. Rendón-Maldonado, Fax: 52961533690
E-mail: jrendon@unpa.mx

Histopathological changes in the liver and stomach of *Didelphis virginiana* (Didelphimorphia: Didelphidae) during natural infection with *Gnathostoma turgidum* (Nematoda: Gnathostomidae)

E.H. Torres-Montoya¹, J.M. Zazuata-Morino², L.U. Osuna-Martínez³,
H. Castillo-Ureta⁴, G. Silva-Hidalgo⁴, H.S. López-Morino⁵, I. Osuna-Ramírez⁶,
E. Noguera-Corona⁷ and J.G. Rendón-Maldonado⁸

¹Laboratorio de Conservación de la Fauna Silvestre, Facultad de Biología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. de las Américas s/n, San Luis Potosí, México; ²Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México; ³Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México; ⁴Facultad de Biología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. de las Américas s/n, San Luis Potosí, México; ⁵Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Biología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. de las Américas s/n, San Luis Potosí, México; ⁶Laboratorio de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México; ⁷Laboratorio de Patología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Tlacotalpa s/n, San Luis Potosí, México

Abstract

Gnathostoma turgidum is a nematode parasite that exploits the stomach of Virginia opossums, *Didelphis virginiana*, in Latin America. The opossum is the definitive host of *G. turgidum* in the wild. Intra-specific growth and maturation of the parasite, subsequent migration to the stomach and spontaneous expulsion are common. However, the histopathological lesions caused by *G. turgidum* are poorly described. A better understanding of the life cycle of the parasite and the pathological changes in natural host-parasite interactions could help to clarify the progression of human infection caused by *Gnathostoma brasiliense*. The aim of this work was to study morphological changes in the liver and stomach of *D. virginiana* during natural infection and adult worm expulsion. Three opossums naturally infected with *G. turgidum* were captured from an endemic area of gnathostomiasis. Three uninfected opossums captured from a non-endemic area were used as controls. The opossums were sacrificed at different stages of infection (March, May and December), and a histopathological study of their livers and stomachs was conducted. Injuries to livers were observed by histopathology – areas of necrosis and collagen spots were identified. Parasitic caused nodules with necrosis in the periphery of lesions, and collagen fibres were also observed in stomachs. Collagen spots may be caused by antigenic remains of the parasite. Further immunological studies are necessary to verify that inflammation is caused by these factors.

Introduction

The nematode *Gnathostoma turgidum* has been reported in eight Mexican states, including San Luis (Hinojosa-Alvarez et al., 2008; Díaz-Camacho et al., 2009), which has been described as an endemic area of human gnathostomiasis with more than 10,000 estimated human cases. *Gnathostoma brasiliense*, a related species, has been reported to be the causative agent of the human disease (Almeyda-Artigas et al., 2000). Both *Gnathostoma* species have been reported in the endemic area, suggesting that they co-inhabit the same location. The prevalence of *G. turgidum*, an aerial parasite of *Didelphis virginiana*, is highest during May and June (Navas et al., 2009). It has been reported that advanced third-stage larvae (A3L) localise to the liver of infected animals from February to April, and subsequently adult worms are located in the stomach from April to July (Díaz-Camacho et al., 2010). The beginning and end of synchronous *G. turgidum* egg expulsion in the faeces of infected *D. virginiana*, as well as the expulsion of adult worms from May to September by spontaneous curing, have been reported (Torres-Montoya et al., 2014). However, the histopathological changes of *D. virginiana* caused by infection with *G. turgidum* are unknown. Although *G. brasiliense* is the reported causative agent of human gnathostomiasis, the histopathology of human infection has been poorly studied, because it is difficult to obtain samples of the parasite from infected humans, due to its migratory behaviour. Experimental infection with *G. brasiliense* in dogs has been reported; however, stomach histopathology has not been studied adequately

© Cambridge University Press 2021

CAMBRIDGE
UNIVERSITY PRESS

Density-independent Infection during *in vitro* Interaction of *Mesocyclops edax*¹ and Second-stage Larvae of *Gnathostoma turgidum*²

José Marcial Zazueta-Moreno^{3,5}, Edith Hilario Torres-Montoya^{4,5}, Hipólito Castillo-Ureta⁴, José Israel Torres-Avendaño⁴, Ignacio Osuna Ramírez³, Vicente Olimón-Andalón⁴, Héctor Samuel López-Moreno³, Lorenzo Ulises Osuna-Martínez³, and José Guadalupe Rendón Maldonado^{3*}

Abstract. While infection by *Gnathostoma turgidum* (Stossich) in the definitive host, the Virginian opossum, *Didelphis virginiana* (Kerr), has been described in wildlife, the complete life cycle of the parasite is unknown. Development of early third-stage larvae of *Gnathostoma* spp. *in vitro*-infected cyclopoids has been evaluated previously. However, factors involved in viability of copepods as first-intermediate hosts for *G. turgidum* and that maintain the life cycle of the parasite in endemic areas of gnathostomosis have not been well studied. In this study, *in vitro* capability of *Mesocyclops edax* (Forbes) to ingest second-stage larvae of *G. turgidum*, and density-dependence relationship with the parasitic load were determined. Average ingestion of 1:5, 1:10, and 1:15 densities were 3.5 ± 0.3 , 7.5 ± 0.6 , and 10.8 ± 1.0 , respectively; whereas parasitic loads of each density in *M. edax* after interaction were 1.7 ± 0.3 , 2 ± 0.3 , and 1.8 ± 0.3 . Parasitic loads of copepods exposed to each density of second-stage larvae were not statistically different. Ingestion capacity by *M. edax in vitro* for larvae was directly proportional to density of larvae. However, the parasitic load tended to remain constant regardless of density of larvae to which the copepod was exposed. The behavior might be limited by the size of the host or co-evolutionary strategies that favor viability and maintenance of the life cycle of the parasite in wildlife.

Introduction

Gnathostoma turgidum (Stossich) is an endemic parasite in wildlife in the Americas. Díaz-Camacho et al. (2009) reported an endemic area of *G. turgidum* in Sinaloa State, Mexico where the parasite showed seasonal behavior in the definitive host, the Virginian opossum, *Didelphis virginiana* (Kerr) (Nawa et al. 2009). Migration and development of the nematode in liver, later maturation to the adult stage in the stomach of the host (Díaz-Camacho et al. 2010), and subsequent expulsion of the parasite as a spontaneous cure were described by Torres-Montoya et al. (2014).

¹Cyclopoda: Cyclopidae

²Nematoda: Gnathostomatidae

³Posgrado en Ciencias Biomédicas and Posgrado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. Av. de las Américas y Blvd. Universitarios S/N, Culiacán, Sinaloa 80010, México.

⁴Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Sinaloa. Av. de las Américas y Blvd. Universitarios S/N, Culiacán, Sinaloa 80010, México.

⁵These authors contributed equally in this work

*Corresponding author: jgrendonm@uas.edu.mx



First report of autochthonous canine leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) mexicana* in Sinaloa, Mexico

Hipólito Castillo-Ureta^{a,1}, José Marcial Zazueta-Moreno^{b,1}, José Guadalupe Rendón-Maldonado^b, José Israel Torres-Avenidaño^a, Héctor Samuel López-Moreno^b, Vicente Olimón-Andalón^a, Víctor Manuel Salomón-Soto^a, Fabiola Patricia Pérez-Sánchez^b, Edith Hilario Torres-Montoya^{a,*}

^a *Departamento Ciencias Biológicas, Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Sinaloa, Av. de las Américas y Blvd. Universidad s/n, Culiacán, Sinaloa, 40010, México*

^b *Programa de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Av. de las Américas y Blvd. Universidad s/n, Culiacán, Sinaloa, 40010, México*

ARTICLE INFO

Keywords:
Leishmania mexicana
Mexico
Sinaloa
Infection
Canine leishmaniasis
Autochthonous

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by different species of protozoan parasite of the genus *Leishmania*. Dogs have been proven as primary hosts of the parasite. Cases of zoonotic leishmaniasis in humans caused by *Leishmania mexicana* have been reported in Sinaloa; however, the vectors and hosts involved in the epidemiology of the parasite in northwestern Mexico are still unknown. Given the public health implications of this parasite's domestic hosts regarding the permanence and transmission of the disease in humans, the objective of the present study was to detect and determine the species of *Leishmania* that caused the first three cases of autochthonous canine leishmaniasis in the state of Sinaloa, Mexico. Three domestic dogs showing symptoms similar to canine leishmaniasis were identified, including chronic eye inflammation, corneal opacity, ocular exudate, emaciation and hypoonia. DNA was extracted from venous blood of the infected animals using a commercial kit. The internal transcribed spacer (ITS-1) of ribosomal DNA (rDNA) was amplified by specific primers for *Leishmania* from the extracted DNA, and the PCR products were digested with the restriction enzyme *Hae*III. In addition, PCR products were subjected to automated sequencing. Molecular analysis showed that the infecting species was *L. mexicana*. This is the first report of autochthonous canine leishmaniasis caused by *L. mexicana* in Sinaloa, Mexico. Further studies are required to identify the species that serve as vectors and other wild and domestic hosts of the parasite, as well as to determine if there are more species of *Leishmania* circulating in Sinaloa.

1. Introduction

Leishmaniasis is one of several neglected tropical diseases caused by different species of the protozoan parasite *Leishmania*; it is transmitted by the bite of hematophagous females of diptera of the genus *Phlebotomus* in the Old World, and of other various genera, including *Lutzomyia* (França, 1924), in the Americas (Mata and Dequaque, 2016). The disease may result in one of three clinical forms: Cutaneous leishmaniasis (CL), mucocutaneous leishmaniasis (MCL) and visceral leishmaniasis (VL). Recent estimates indicate an annual global incidence of 0.2–0.4 million cases of VL and 0.7–1.2 million cases of CL. It is currently estimated that the disease affects 12 million people, and 350 million are at risk of infection (Clever and Uzonna, 2016). The genus

Leishmania has a cosmopolitan distribution, and has been reported in at least 96 countries (Ayar et al., 2012). In the Americas, the geographical distribution of *Leishmania* spp. extends from the southern United States to the north of Argentina, where the main species reported are *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. amazonensis*, *L. colombiense*, *L. infantum*, *L. peruviana*, *L. pifanoi* and *L. mexicana*, each with a different epidemiological and demographic pattern (Tricazari et al., 2007). In Mexico, *L. mexicana* has the highest number of reports as a causative agent of CL in humans in the states of Campeche, Chiapas, México City, Jalisco, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Quintana Roo, Sinaloa, Tabasco, Veracruz and Yucatán (Dirección General de Epidemiología (DGE), 2018; Pérez-Vega et al., 2009; Olmos-Gil et al., 2012). In relation to the life cycle of the parasite and the hosts that are involved in

* Corresponding author.
E-mail address: edith14@uasulsa.mx (E.H. Torres-Montoya).
¹ These authors contributed equally in this work.

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.11.027>
Received 16 August 2018; Received in revised form 26 November 2018; Accepted 26 November 2018
Available online 27 November 2018
0001-706X/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

XV. SIGLAS Y ABREVIACIONES

Abreviación o sigla: definición.