

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**EVALUACIÓN *in vitro* DE LA MOTILIDAD DE HUEVOS LARVADOS DE
Toxocara canis LUEGO DE LA EXPOSICIÓN A COMPUESTOS METÁLICOS DE
TRANSICIÓN, LIGANDOS DERIVADOS DE AZOLES Y SOLUVET®**

POR

VALERIA ALEJANDRA TREVIÑO GARZA

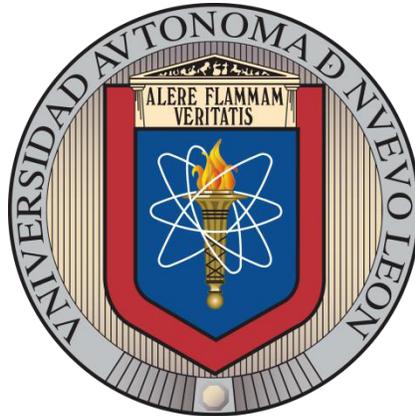
**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAestrÍA EN CIENCIA ANIMAL**

NOVIEMBRE, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



EVALUACIÓN *in vitro* DE LA MOTILIDAD DE HUEVOS LARVADOS DE *Toxocara canis* LUEGO DE LA EXPOSICIÓN A COMPUESTOS METÁLICOS DE TRANSICIÓN, LIGANDOS DERIVADOS DE AZOLES Y SOLUVET®

Por

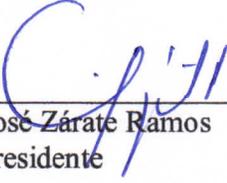
VALERIA ALEJANDRA TREVIÑO GARZA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
Maestría en Ciencia Animal

Noviembre, 2017

EVALUACIÓN *in vitro* DE LA MOTILIDAD DE HUEVOS LARVADOS DE *Toxocara*
canis LUEGO DE LA EXPOSICIÓN A COMPUESTOS METÁLICOS DE
TRANSICIÓN, LIGANDOS DERIVADOS DE AZOLES Y SOLUVET®

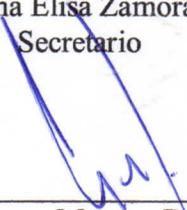
Comité de tesis



Dr. Juan José Zárate Ramos
Presidente



Dra. Diana Elisa Zamora Ávila
Secretario



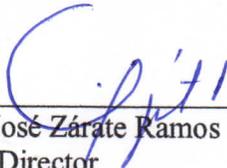
M. C. Gustavo Moreno Degollado
Vocal



M. C. Andrea González Báez
Vocal

EVALUACIÓN *in vitro* DE LA MOTILIDAD DE HUEVOS LARVADOS DE *Toxocara canis* LUEGO DE LA EXPOSICIÓN A COMPUESTOS METÁLICOS DE TRANSICIÓN, LIGANDOS DERIVADOS DE AZOLES Y SOLUVET®

Dirección de tesis



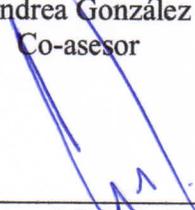
Dr. Juan José Zárate Ramos
Director



Dra. Diana Elisa Zamora Ávila
Co-asesor



M. C. Andrea González Báez
Co-asesor



M. C. Gustavo Moreno Degollado
Co-asesor

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por el apoyo económico brindado para la realización de esta investigación.

Al Dr. John Jady Hurtado Belancázar, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes (Colombia), quien proporcionó parte del material biológico.

A mis asesores por el tiempo que han dedicado para la formación de recursos humanos enfocados a la investigación y mejora de aspectos relacionados a la Salud Pública.

A mis compañeros de laboratorio, por hacer más fácil este trayecto.

DEDICATORIA

A Dios.

A mi familia. Shekh Ma Shieraki Anni.

A mis compañeros de generación.

DRACARYS.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Índice de tablas | |
| Índice de figuras | |
| Resumen | |
| Introducción | 1 |
| Antecedentes | |
| Generalidades | 2 |
| Taxonomía | 2 |
| Morfología del adulto | 2 |
| Morfología del huevo | 3 |
| Ciclo biológico | 4 |
| Epidemiología | 5 |
| Diagnóstico | 7 |
| Hallazgos clínicos en perros infectados | 7 |
| Hallazgos clínicos en humanos infectados | 9 |
| Aspectos moleculares | 9 |
| Fuentes de contaminación ambiental | 10 |
| Medios y condiciones para la maduración de <i>HTc</i> | 11 |
| Criterios de viabilidad para nematodos | 11 |
| MTT | 12 |
| Compuestos químicos | |
| Desinfectantes | 12 |
| Soluciones de superoxidación (SSO) | 13 |
| Complejos metálicos | 14 |
| Azoles y derivados | 14 |
| Justificación | 14 |
| Hipótesis | 15 |
| Objetivo general | 16 |
| Objetivos específicos | 16 |
| Materiales y métodos | |
| Obtención del material biológico | 16 |
| Extracción de huevos de <i>T. canis</i> | 17 |
| Estandarización de técnicas usadas para la maduración de huevos de <i>T. canis</i> | 18 |
| Criterios de viabilidad para nematodos previo a la exposición de tratamientos | 18 |
| Origen de los tratamientos | 19 |
| Exposición a tratamientos | 20 |
| Análisis estadístico | 21 |
| Resultados | 21 |
| Discusión | 24 |
| Conclusión | 26 |
| Referencias | 27 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|---------|---|----|
| Tabla 1 | Protocolos usados para evaluar actividad biológica de MTT | 18 |
| Tabla 2 | Compuestos metálicos de transición y ligandos derivados de azoles | 19 |
| Tabla 3 | Preparación de compuestos metálicos de transición y ligandos derivados de azoles | 20 |
| Tabla 4 | Escala de motilidad | 21 |
| Tabla 5 | Resultado de reacción de óxido-reducción de cristales de formazán y su efecto en la motilidad de <i>HTc</i> | 22 |
| Tabla 6 | Resultados de acuerdo a escala de motilidad y su significancia estadística | 23 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1 | Parásito adulto de <i>T. canis</i> | 3 |
| Figura 2 | Huevo larvado de <i>T. canis</i> | 4 |
| Figura 3 | Ciclo infeccioso en hospedadores paraténicos de <i>T. canis</i> | 5 |
| Figura 4 | Colección de adultos | 17 |
| Figura 5 | Hembras adultas y huevos colectados | 17 |
| Figura 6 | Derivados de azoles | 19 |
| Figura 7 | Compuestos metálicos de transición con ligandos derivados de azoles | 19 |
| Figura 8 | Grupos de <i>HTc</i> en medios de cultivo | 22 |
| Figura 9 | Muestra de tratamiento con BIBCu^{2+} | 23 |
| Figura 10 | Muestra de tratamiento /control versus DMTCu^{2+} | 24 |

ABREVIATURAS

| | |
|------------------------|--|
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| MTT | Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol |
| SSO | Solución de superoxidación |
| NaOH | Hidróxido de sodio |
| SSF | Solución salina fisiológica |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| Co²⁺ | Cobalto |
| Cu²⁺ | Cobre |
| Zn | Zinc |
| mM | Milimoles |
| HTc | Huevos de <i>Toxocara canis</i> |
| L2 | Larva etapa 2 de <i>Toxocara canis</i> |
| L3 | Larva etapa 3 de <i>Toxocara canis</i> |
| L4 | Larva etapa 4 de <i>Toxocara canis</i> |
| PCR | Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de polimerasa) |
| NT | Neurotoxocariosis |
| TO | Toxocariosis ocular |
| LMV | Síndrome de larva migrante visceral |
| BZ | Benzimidazoles |

INTRODUCCIÓN

Toxocara canis es un parásito intestinal que tiene como hospedero definitivo al perro y sus congéneres. Es el principal causante, junto con *Toxocara cati*, de la enfermedad conocida como toxocariosis en humanos, una de las helmintiasis con mayor prevalencia a nivel mundial en países industrializados (Chen *et al.*, 2012). Esta enfermedad puede ser asintomática o puede mostrar síndromes clínicos causados por la migración de la larva de *Toxocara* spp. a través del sistema circulatorio y diversos órganos internos, mismo que varían de acuerdo a la intensidad de la infección y la capacidad del sistema inmune para contrarrestar la infección (Macpherson, 2013).

Una de las principales fuentes de infección por huevos de *Toxocara* spp. que logran desarrollarse hasta el estado infectivo L2 para el humano, es su fácil distribución a través de las heces de perros, gatos y otras especies de cánidos (Overgaaauw, 2013). Los huevos de *Toxocara canis* son casi esféricos y miden de 75-90 μm . Poseen una cubierta gruesa y rugosa con varias capas concéntricas. Son de color marrón oscuro, no segmentados y su contenido ocupa prácticamente todo el interior. Tienen una cubierta compuesta por tres capas: interna o lipídica, media o quitinosa y externa o vitelina, que le confieren la impermeabilidad a cualquier sustancia que no sea gas o disolvente lipídico.

Las drogas antihelmínticas mayormente usadas para el tratamiento de la toxocariasis humana pertenecen al grupo de los benzimidazol-carbamatos (Pawlowski, 2001), sin embargo, tienen una biodisponibilidad baja en los tejidos, debido a su extremadamente baja solubilidad (Hrckova *et al.*, 2001).

Las soluciones superoxidadas electrolizadas (SSO) son soluciones ácidas, carentes de color con un alto potencial de reacción óxido-reducción (Tanaka *et al.*, 1996). En el caso de la producción de soluciones con pH neutro, el agua es tratada con características fisiológicas específicas y una solución saturada de cloruro de sodio grado reactivo es sometido a un proceso de electrólisis controlada para la generación de iones.

La ventaja de estos procesos es que resulta una solución con un pH neutro de 6.4 a 7.5, con capacidad de oxidación-reducción de +800 a +900 mV (Durán, 2010).

Desde su aparición, estas soluciones han llamado la atención por su efectividad contra bacterias, virus, hongos, esporas y micobacterias, así como su baja toxicidad en tejidos y fácil manejo en el almacenamiento, uso y desecho.

Los azoles son compuestos químicos que contienen una estructura cíclica aromática con dos heteroátomos, en el que al menos uno de ellos tiene un átomo de nitrógeno.

En bacterias, los azoles actúan como inhibidores de proteínas reductasas, relacionadas con la síntesis de ácidos grasos. Cuando estos azoles son ligados a Co^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} se potencializa la actividad antimicrobiana. Esta relación se debe a que los azoles tienen mayor solubilidad, biodisponibilidad e interacción con el ADN a través de asociaciones intermoleculares (Castillo *et al.*, 2016)

ANTECEDENTES

GENERALIDADES

Taxonomía

Toxocara canis forma parte del Phylum Nematoda, Clase Secernetea, Orden Ascaridida, Superfamilia Ascaroidea, familia Toxocaridae, Género *Toxocara*, que contiene una gran cantidad de géneros formados por gusanos largos intestinales, capaces de afectar a una variedad de vertebrados.

La toxocariosis es una de las enfermedades más comunes en perros, provocadas por nematodos, específicamente de las especies *Toxocara* spp. (Moreira *et al.*, 2014).

Diferentes mamíferos, incluyendo el ser humano, pueden ser infectados a través de la ingestión accidental de huevos larvados de *Toxocara* spp., o bien, por consumo de vísceras o carne mal cocidas de hospederos paraténicos infectados (Choi *et al.*, 2008).

Morfología del adulto

Los machos miden 4-10 cm. x 2-3 cm. de diámetro, mientras que las hembras miden de 5-18 cm., su boca está bordeada por tres labios. También en su parte anterior posee dos proyecciones cuticulares características del género, conocidas como alas cervicales, que miden 2.5 x 0.2 mm. y le dan a la parte anterior del parásito la forma característica de punta de flecha (Cordero del Campillo & Rojo Vázquez, 1999).

Los adultos se establecen y viven en el intestino delgado de los cánidos, luego de una migración hepato-cardio-pulmonar, misma que realizan los distintos estadios larvarios.



Fig. 1. Parásito adulto de *T. canis*

Morfología del huevo

Los parásitos adultos producen huevos que son eliminados al medio ambiente a través de las heces (Taira *et al.*, 2004). Estos son casi esféricos y miden de 75-90 μm y poseen una cubierta gruesa y rugosa con varias capas concéntricas. Son de color marrón oscuro, no segmentado y su contenido ocupa prácticamente todo el interior. Se acepta que los huevos de los nematodos en general, tienen una cubierta compuesta por tres capas: interna o lipídica, media o quitinosa y externa o vitelina. La capa lipídica está compuesta mayormente por ascárosidos y un 25% de proteínas. Los ascárosidos son glucolípidos exclusivos de los nematodos, compuestos por un azúcar y un alcohol unidos por enlaces glucosídicos. Estos compuestos son los responsables de la impermeabilidad de los huevos de *Toxocara canis* a cualquier sustancia que no sea gas o disolvente lipídico. La capa quitinosa está constituida por quitina, un polisacárido compuesto por unidades de N-acetilglucosamina, que ofrece un soporte similar al exoesqueleto de los artrópodos. La capa vitelina del huevo es similar en composición a la capa externa del parásito adulto, es rica en carbohidratos y es la responsable de establecer los mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria del hospedador (Cordero del Campillo & Rojo Vázquez, 1999).



Fig. 2. Huevo larvado de *T. canis*

Ciclo biológico

Toxocara canis tiene un ciclo vital complejo con cuatro posibilidades de infección: vía directa, mediante la ingestión de huevos larvados, vía transplacentaria y vía lactogénica.

El desarrollo de los huevos toma lugar fuera del hospedador, es decir, en el medio ambiente. El estadio L2 representa el ciclo infectante, que tras infectar a su hospedador, pueden seguir dos vías: traqueodigestiva y migración somática.

Las larvas que eclosionan del huevo penetran en la mucosa del intestino delgado, pasan a circulación sanguínea e inician una larga migración intraorgánica. A las 24-48 horas, llegan al hígado por vía portal.

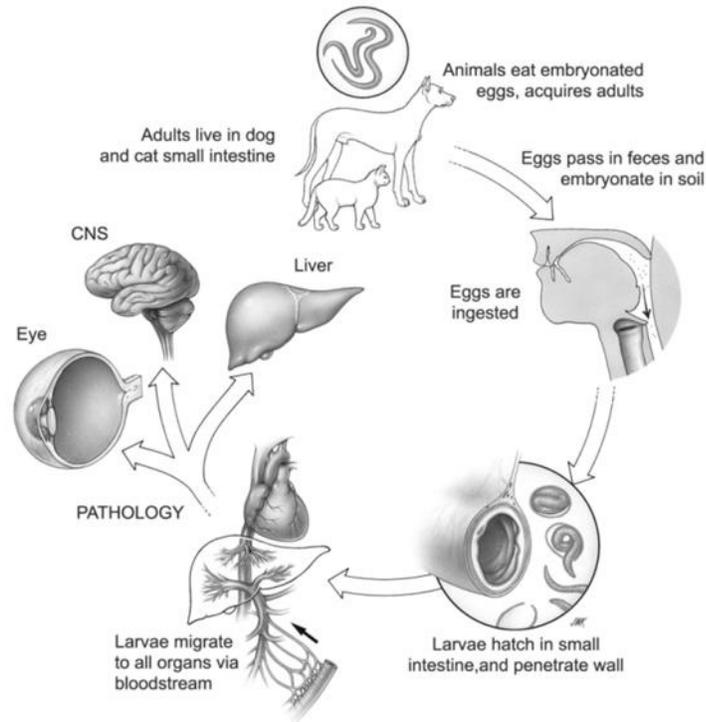


Fig. 3. Ciclo infeccioso en hospedadores paraténicos de *T. canis* (Despommier, 2003).

En perros jóvenes, menores a 6 meses, la larva crece considerablemente al llegar a los pulmones (0.8-0.9 mm), alcanzando el doble de tamaño al llegar al hígado (Owen, 1930).

Epidemiología

La toxocariosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial, término que es aplicado a la infección provocada por *Toxocara* spp, siendo las especies *T. canis* y *T. cati* las más importantes en relación a la prevalencia de helmintiasis en países industrializados, representando un problema negligente de salud pública (Magnaval *et al.*, 2001).

La infección humana relacionada a *Toxocara canis* y *Toxocara cati* fue descrita por primera ocasión por Wilder en 1950. Estos parásitos han sido detectados en órganos como el ojo, pulmones e hígado.

Existen cuatro reservorios epidemiológicos: infecciones intestinales en hospederos definitivos, huevos en el ambiente, larvas en huéspedes accidentales y larvas somáticas en diversos hospederos (Schnieder *et al.*, 2011).

Actualmente, el Consejo Europeo para el Control de las Parasitosis en Animales de Compañía (ESCCAP 2017) recomienda la desparasitación en perros mayores a 6 meses al menos cuatro veces al año.

Diversos estudios han demostrado que existen altas tasas de contaminación (10-30%) por *HTc* en patios traseros, areneros, parques públicos, áreas de juegos infantiles, lagos y otros lugares públicos (Mizgajska-Wiktor and Uga, 2006). Destacan hábitos como la geofagia y el uso de parques públicos como un factor de riesgo en niños y perros menores a 6 meses de edad.

En relación a nuestro país, existen diversos estudios realizados tanto en áreas rurales como en áreas densamente pobladas.

Rodríguez-Vivas y colaboradores (2011), realizaron un estudio sobre la prevalencia de parásitos intestinales en 130 perros en una comunidad rural del estado de Yucatán y los factores asociados a la zoonosis. El 80% de los perros muestreados (104 individuos) resultaron positivos a la presencia de parásitos intestinales, en donde *T. canis* estaba presente en 6.2% de ellos. Individuos con factores asociados a la edad (menores a 2 años) y pobre condición corporal, tenían mayor riesgo de adquirir la infección.

Núñez y colaboradores (2013), evaluaron un total de 108 muestras séricas de pobladores entre 24 meses a 16 años de edad en la ciudad de Ecatepec (Estado de México), en donde 22.22% de las muestras resultaron seropositivas a *T. canis*. Observaron una mayor prevalencia en hombres que en mujeres, 28.84% y 16.07%, respectivamente, mientras que los niños (2 a 11 años) presentaron una tendencia menor comparada con el grupo de sujetos de mayor edad (12 a 16 años), con 4.62% y 17.59%, respectivamente. Así mismo, encontraron que el 80% de niños con seropositividad tenían malos hábitos higiénicos, previo a la ingestión de alimentos, por lo que el riesgo de contaminación era aún mayor.

Los huevos de *Toxocara* spp. son muy adhesivos y difíciles de remover del pelo del perro o gato, facilitando su ingestión accidental por el humano. En un estudio realizado por Roddie y colaboradores en el año 2008, analizaron 100 perros callejeros para

determinar la presencia de huevos de *T. canis* en heces y en el pelo, de manera significativa la gran mayoría de huevos recuperados el (95%) provenían de muestras tomadas de cachorros a pesar de que solo una cuarta parte (25%) de las muestras totales tomadas provenían de estos individuos.

Diagnóstico

La detección adecuada y la vigilancia sobre la contaminación ambiental con *HTc* son las acciones más importantes para prevenir y controlar la infección en diferentes hospederos.

Si bien la presencia de eosinofilia crónica es considerada un indicador confiable en el diagnóstico de helmintiasis, las técnicas de laboratorio usadas más efectivas y económicas son las relacionadas a las pruebas inmunológicas (Magnaval *et al.*, 2001). La más común es la prueba ELISA, usando antígenos secretores-excretos de *T. canis* secretados por la larva, mantenida previamente en cultivo (Smith y Nordin, 2006), teniendo un 90% de especificidad y 80% de sensibilidad.

Hallazgos clínicos en perros infectados

Durante el proceso natural de infección, los *HTc* se desarrollan en el medio ambiente hasta su etapa infectiva. Las larvas se desarrollan en su interior hasta el estadio L2 en un promedio de 0 a 15 días. Los *HTc* son ingeridos por sus hospederos naturales (hospederos definitivos), sin embargo, también pueden ser ingeridos por hospederos no naturales (hospederos paraténicos) como los roedores (ratones, ratas) e incluso seres humanos. Las larvas eclosionan en el intestino, atraviesan la pared intestinal y emigran hasta los pulmones a través de la vena porta y el hígado. En los pulmones mudan a L3 y de ahí, pasan a la tráquea y, por tos o estornudos, son expulsadas al exterior o llegan a la boca y son deglutidas. Esta migración dura unos 10 días. Una vez ingerida, la larva L3 llega hasta el intestino y muda a L4 y al estado adulto, en total 25 a 30 días tras la infección, y posteriormente ya como adultos empiezan a producir huevos que serán eliminados al medio junto con las heces. Esta modalidad del ciclo biológico ocurre en cachorros, sin embargo, en perros de más de 3 meses este ciclo se hace cada vez menos frecuente, y por encima de los 6 meses ya no se da. En su lugar, las larvas L3 inician una

migración somática que puede llevarlas a numerosos órganos como el hígado, los pulmones, el corazón, el cerebro, músculo esquelético y a la pared del tracto gastrointestinal. En estos órganos acaban encapsulándose e inician una etapa de hipobiosis y pueden permanecer infectivas durante años. En esta migración somática, las larvas pueden llegar también a las glándulas mamarias de las hembras y a través de la leche contaminada con larvas infecciosas, puede llegar a los cachorros, sobre todo durante las tres primeras semanas de lactancia. Por esta vía, las larvas no harán una migración somática dentro del cachorro, sino que se instalarán directamente en el intestino donde completan el ciclo y empiezan a poner huevos. La madre puede reinfectarse con estos huevos al lamer al cachorro. También puede ocurrir la infección intrauterina, en la cual las hembras gestantes, previamente infectadas y con larvas hipobióticas somáticas, unos tres meses antes del parto se reactivan, atraviesan la placenta y se instalan en los pulmones del feto donde mudan a L3, justo antes del parto. De allí y a través de la tráquea alcanzan el intestino del cachorro donde completan el desarrollo hasta llegar a la etapa adulta. Basta una sola infección de la madre, para que ésta pueda infectar a los cachorros incluso de camadas subsecuentes, es decir, una primo infección, incluso en ausencia de reinfección puede dar lugar a varias infecciones transplacentarias.

La primera sospecha de infección en animales jóvenes es el crecimiento lento y la pérdida de peso. Presentan el pelo opaco y la cavidad abdominal inflamada. Los nematodos pueden ser vomitados y encontrados en heces con moco (diarrea) (Merck Veterinary Manual, 2016).

La infección experimental de perros menores a 5 de edad con *HTc* mostró que las larvas alcanzaron su desarrollo en el tracto digestivo. Se evidenció el progreso de la infección, resultando en la presencia de la larva L2 en el hígado y pulmones. Al llegar a los pulmones, comienza el desarrollo de la larva L3, que migra al estómago y madura al estado adulto en el intestino. Los cachorros con infecciones severas pueden desarrollar neumonía, ascitis, hígado graso y enteritis mucoide.

Hallazgos clínicos en humanos infectados

La toxocariosis humana es una infección causada por la larva de *Toxocara* spp., de distribución mundial, especialmente en áreas tropicales. Es encontrada comúnmente en niños con malos hábitos de higiene y sobre todo en aquellos que tienen contacto con animales (Filho *et al.*, 2002).

Su manifestación y el proceso clínico es determinado por el tamaño de la inoculación, frecuencia de reinfección, localización de la larva y la respuesta inmune del hospedador, además de ser demostrado gracias a la detección de anticuerpos IgG contra antígenos el sistema secretor-excretor de la larva (Maizels, 2013).

La localización de la larva puede identificarse a través del examen clínico y técnicas de imagenología si la larva se encuentra alojada en el ojo, cerebro o hígado.

Existen diferentes formas de presentación clínica de la enfermedad: toxocariosis ocular (TO), toxocariosis neurológica (NT) y síndrome de larva migrante visceral (LMV).

En TO, la larva migrante puede ocasionar daño en la retina, induciendo reacciones granulomatosas y en casos severos la pérdida de la visión.

Los signos clínicos que forman parte de la clasificación del síndrome LMV, es reflejado como consecuencias de respuestas inflamatorias debido a la migración de la larva a través de las vísceras. Se presenta generalmente en niños menores a 5 años, con signos como fiebre, inflamación del hígado y bazo, deficiencias del tracto respiratorio bajo que pueden desarrollar asma (Bujis *et al.*, 1997).

En NT se han presentado signos como ataques nerviosos, síntomas neuropsiquiátricos, encefalopatías, acompañados con miocarditis y nefritis (Despommier, 2003).

Aspectos moleculares

El genoma de *T. canis* analizado hasta el momento, indica que tiene 18 cromosomas y 317 pb. Este contiene al menos 18,596 genes codificantes de proteínas que incluye peptidasas, en las que predominan metaloproteinasa M12, cisteínasa C01 y C02 y serinasas S01, S08 y S09, enzimas de gran interés por su presencia en productos secretores/excretores (TES) de *T. canis*. Biológicamente, el secretoma es un conjunto de biomoléculas que están involucradas en diversos procesos celulares (Ditgen *et al.*, 2014). El secretoma de *T. canis* es rico en enzimas proteolíticas como las peptidasas,

moléculas que facilitan la penetración y degradación de tejidos, además de modular o suprimir la respuesta del sistema inmune del hospedador (Zhu *et al.*, 2015). También se encuentran secuencias codificantes de quinasas, fosfatasa, receptores de miembros de la familia de rhodopsinas, secretinas y feromonas; transportadores relacionados a la familia ABC (importadores o exportadores) y canales iónicos que facilitarían el transporte de moléculas como el K⁺. Un total de 9,283 secuencias proteicas han sido clasificadas dentro de 3 principales categorías funcionales: a) Procesos biológicos, b) Funciones moleculares y c) Componentes celulares (Kong *et al.*, 2016).

Fuentes de contaminación ambiental

Si bien, se asume que la infección por *T. canis* tiene relación con la cantidad de huevos infectivos en el medio ambiente, es importante tener el conocimiento de las fuentes que faciliten la propagación ambiental.

Morgan y colaboradores (2013) realizaron un estudio en la ciudad de Bristol, Reino Unido, y demostraron que es posible estimar las fuentes de contaminación por *Toxocara* spp entre perros, gatos y zorros. Determinaron que del grupo de perros positivos, los no castrados fueron los que producían la mayor cantidad de huevos que contaminan el ambiente. La prevalencia se vio disminuida de acuerdo a la edad de los perros positivos, aunque se mantuvo alta en perros de 9 a 12 semanas de edad. Encontraron que la proporción de huevos infectivos que llegan al medio ambiente, está relacionado fuertemente con la recolección y deposición adecuada de las heces. Mizgajska-Wiktor y colaboradores (2017) dirigieron un estudio a largo plazo (1997-2017) en localidades de Polonia, en donde evaluaron 3,309 muestras de suelo. Concluyeron que el grado de contaminación del suelo con huevos de *Toxocara* spp. (14.9%) fue mayor en localidades citadinas que en poblados alejados de la ciudad. Los huevos se concentraban especialmente alrededor de los hogares y en menor proporción en parques y areneros públicos, provocando un alto riesgo de transmisión de toxocariosis a humanos durante todo el año.

Medios y condiciones para la maduración de HTc

Los huevos de *Toxocara* spp. usados para ensayos experimentales, son obtenidos a través de la disección del útero de las hembras adultas, colectadas de perros infectados naturalmente (Savigny, 1975).

Diferentes medios de maduración han sido usados para promover el desarrollo adecuado del embrión, bajo condiciones óptimas. Los medios de maduración varían de acuerdo a las condiciones climatológicas donde es realizado el experimento.

Zibaei *et al.* (2007) colocaron el sedimento que contenía los huevos de *T. canis* en tubos Eppendorf, adicionado con 2.5% de formalina, para evitar su contaminación. Además, condicionó la temperatura ambiental a 25°C con 9.8% de humedad, hasta observar el desarrollo larvario infectivo, monitoreado y oxigenando la muestra periódicamente.

Resende *et al.* (2015) probaron el protocolo que consistió en el aislamiento de los huevos vía maceración mecánica del útero de las hembras, mismos que fueron cultivados satisfactoriamente con una solución de H₂SO₄, bajo temperatura controlada de 26°C, durante seis semanas. A diferencia de este autor, Pinelli *et al.* (2007), después de colectar los huevos, probaron el mismo medio, sin embargo, lo hicieron a temperatura controlada en un cuarto oscuro, logrando el desarrollo embrionario en el mismo lapso.

Otro método de incubación, simple y económico, fue el usado por Heuer *et al.* (2015), en el que usaron agua de grifo, en una incubadora a 25° durante un periodo de 4 a 6 semanas.

Criterios de viabilidad para nematodos

Actualmente, la evaluación de la viabilidad de huevos está basada en la determinación de las estructuras morfológicas durante la observación bajo microscopio o bien, por el desarrollo larvario durante el periodo de incubación.

Johnson *et al.*, (1998) determinaron la viabilidad de huevos de *Ascaris suum* basados en el desarrollo larvario durante la incubación, indicando que si el huevo y su interior se encontraban degenerados o sin desarrollo, sería considerado como muerto, mientras que si había presencia de división celular sería considerado como vivo.

Diversos ensayos han sido realizados para evaluar la viabilidad de HTc, en el que incluyen el uso de animales de laboratorio como método de viabilidad objetiva.

MTT

El MTT es un compuesto usado en pruebas de viabilidad de células eucariotas, ya que facilita la identificación de las células metabólicamente activas o viables, convirtiendo el sustrato a un producto fluorescente color morado que puede ser evaluado a través de un lector de placas (Sittampalam *et al.*, 2004).

El sustrato de MTT es preparado sobre una solución fisiológicamente balanceada, y usualmente termina teniendo una concentración final de 0.2 a 0.5 mg/ml.

La cantidad de formazán es medida de acuerdo al registro de cambios de absorbancia a 570 nm, usando un espectrofotómetro. La longitud de onda usada para cultivos celulares varía de 510 a 630 nm, aunque para nematodos como *Haemonchus contortus* puede variar hasta 575 nm.

Células con metabolismo activo, transforman el MTT en un producto de color morado. Cuando las células mueren, pierden la habilidad de convertir el MTT en formazán. Algunos mecanismos considerados para la reducción a formazán involucran la reacción de la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido de hidrógeno o NADH (Goodwin *et al.*, 1995).

La cantidad de señal generada es dependiente de diversos factores, entre los que destacan la concentración de MTT, el periodo de incubación, el número de células viables y su actividad metabólica.

COMPUESTOS QUÍMICOS

Desinfectantes

Existen diversos estudios que han buscado proponer alternativas de desinfección para diferentes organismos patógenos, sin embargo, los que contemplan huevos de nematodos en etapas infectivas dentro de sus protocolos, son limitados.

Shalaby *et al.* (2011) desarrollaron ensayos similares al presente estudio con *HTc* usando yodo, glutaraldehído, cloruro de benzalconio, permanganato de potasio, alcohol etílico, hidróxido de potasio, soluciones fenólicas y peróxido de hidrógeno, con resultados parcialmente favorables como método de desinfección.

Diferentes métodos usados para la desinfección de aguas residuales, como cloro y radiación ultravioleta no han sido efectivos en la eliminación de algunos

microorganismos debido a sus estructuras resistentes y facilidad de propagación (Mun *et al.*, 2009).

La resistencia elevada de los HTc ha desarrollado una búsqueda en elementos que faciliten su desinfección, entre ellos radiación emitida por rayos x y γ (Kamiya *et al.*, 1987), además de ozono (Finch *et al.*, 1993).

Soluciones superoxidadas (SSO)

Las soluciones superoxidadas electrolizadas (SSO) son soluciones ácidas, carentes de color con un alto potencial de reacción óxido-reducción (Tanaka *et al.*, 1996). Sin embargo, la inestabilidad y el potencial de corrosión de estas soluciones promovió el desarrollo de nuevas tecnologías, usadas principalmente para la desinfección de equipo de laboratorio y áreas clínicas.

La electrólisis es un proceso en el que una corriente eléctrica es pasada a través de agua o alguna solución, generando diversos reactivos químicos que dependen del soluto usado y el material de electrodos. Durante este proceso, las moléculas son jaladas a una cámara con polos positivo y negativo, produciendo una solución con radicales libres de hipoclorito de sodio. El producto final es una solución superoxidada con pH neutro que tiene como vida media 12 meses (Eftekharizadeh *et al.*, 2016). En el caso de la producción de soluciones con pH neutro, el agua es tratada con características fisiológicas específicas y una solución saturada de cloruro de sodio grado reactivo es sometido a un proceso de electrólisis controlada para la generación de iones.

La ventaja de estos procesos es que resulta una solución con un pH neutro de 6.4 a 7.5, con capacidad de oxidación-reducción de +800 a +900 mV (Durán, 2010).

Desde su aparición, estas soluciones han llamado la atención por su efectividad contra bacterias, virus, hongos, esporas y micobacterias, así como su baja toxicidad en tejidos y fácil manejo en el almacenamiento, uso y desecho.

Complejos metálicos

Debido a la resistencia a los antibióticos, el desarrollo de nuevos compuestos contra agentes microbianos es un tema emergente.

En bacterias, los azoles actúan como inhibidores de proteínas reductasas, relacionadas con la síntesis de ácidos grasos. Cuando estos azoles son ligados a Co^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} se potencializa la actividad antimicrobiana. Esta relación se debe a que los azoles tienen mayor solubilidad, biodisponibilidad e interacción con el ADN a través de asociaciones intermoleculares (Castillo *et al.*, 2016).

La lipofilia de los complejos metálicos aumenta la capacidad de penetración dentro de las membranas lipídicas y bloquea los sitios de enlace metálicos de las enzimas del microorganismo, y consecuentemente la actividad biocida aumenta. Estos complejos son altamente potentes debido a su tendencia hacia la unión de los componentes biológicos en el citoplasma, incluidos las enzimas, ADN y ARN.

Está claro que la actividad biocida de algunos complejos se puede atribuir a la naturaleza polar de las bases y la carga positiva de los átomos de nitrógeno (Negm *et al.*, 2010).

Azoles y derivados

Los azoles son compuestos químicos que contienen una estructura cíclica aromática con dos heteroátomos, en el que al menos uno de ellos tiene un átomo de nitrógeno.

La actividad antimicrobiana y antifúngica de los azoles, se relaciona con la habilidad de unirse a enzimas y receptores de diversos microorganismos; en hongos, los azoles se unen al cofactor heme localizado en el sitio activo del citocromo P450 e inhibe la conversión del lanosterol al ergosterol, que forma parte de la síntesis de la membrana celular (Castillo *et al.*, 2016).

El uso potencial de estos compuestos como terapéuticos para enfermedades parasitarias, por ejemplo los derivados de la familia de benzimidazoles (BZ), se estableció desde el año 1950, teniendo como origen principal la molécula α -D-ribofuranacil, parte integral de la vitamina B₁₂. En general, los BZ carbamatos, son materiales cristalinos con alto punto de fusión y casi insolubles en agua, tienen como mecanismo de acción la inhibición de la polimerización de la proteína tubulina, que forma parte de los microtúbulos, principal componente del citoesqueleto de los parásitos (Sumano y Ocampo, 1997).

JUSTIFICACIÓN

La parasitosis por *Toxocara canis* es de una elevada prevalencia en los caninos y sus congéneres salvajes, quienes son los hospedadores naturales de este parásito. Por otro lado, la biología de este parásito le confiere un gran potencial de transmisión tanto inter especies como extra especies, características biológicas tales como parasitosis masivas, más de 50 parásitos por animal, gran prolificidad de las hembras, ya que son capaces de producir más de 100,000 huevos al día. Los HTc son sumamente resistentes a los agentes desinfectantes comunes y pueden permanecer viables en el medio ambiente por meses e incluso hasta por un año. En su hospedero natural, este parásito posee las más variadas formas de transmisión, como lo es la forma oral, lactogénica, transplacentaria e incluso a través de hospederos paraténicos, siendo los seres humanos hospedadores paraténicos de esta parasitosis. Los seres humanos se pueden infectar de tal forma que esta parasitosis constituye una de las zoonosis emergentes de mayor interés en la actualidad, con una prevalencia elevada sobre todo en niños menores de 12 años. En el ser humano, se distinguen varios síndromes, afectando diversos tejidos y provocando diversas patologías en tejidos tales como en el cerebro, ojo, pulmón, hígado, riñón y músculo esquelético entre otros.

El estrés químico causado por la presencia de metales como plata, cobre, zinc, fierro, aluminio y titanio ha sido demostrado como agente tóxico contra bacterias y hongos (Castillo *et al.*, 2016).

Ha sido demostrado que la interacción entre algunos metales, causa daño estructural y adelgazamiento de las cubiertas del huevo de *Toxocara canis*, lo que pudiera poner en riesgo la viabilidad de la larva (Magaña-López *et al.*, 2016).

Por lo anterior, es de vital interés encontrar compuestos que permitan la inactivación de las formas infecciosas para animales y seres humanos.

HIPÓTESIS

El uso de compuestos metálicos de transición y ligandos derivados de azoles y/o el producto comercial Soluvet® disminuirá la motilidad de huevos larvados de *Toxocara canis*.

OBJETIVO GENERAL

Describir el efecto de compuestos metálicos ligados a azoles y Soluвет® sobre la motilidad de huevos larvados de *Toxocara canis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarización de técnicas usadas para la maduración de huevos de *T. canis*.
 - a. Hidróxido de sodio (NaOH) al 1%
 - b. Solución salina fisiológica (SSF)
2. Evaluar criterios de viabilidad para nematodos previo a la exposición a los tratamientos
 - a. Lote aceptable de huevos larvados (Oaks and Kayes, 1979).
 - b. Interacción de MTT como método de viabilidad para L2 de *Toxocara canis*
3. Determinar la motilidad de L2 de *Toxocara canis* después de 2 y 4 horas de exposición a 7 tratamientos de acuerdo a la escala de Reis *et al.* (2010).
 - a. Ligandos de azoles
 - b. Compuestos metálicos de transición ligados a azoles
 - c. Soluвет®

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de material biológico

Los nematodos de *T. canis* fueron obtenidos a partir de perros naturalmente infectados y procesados en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) (Fig. 4).



A



B

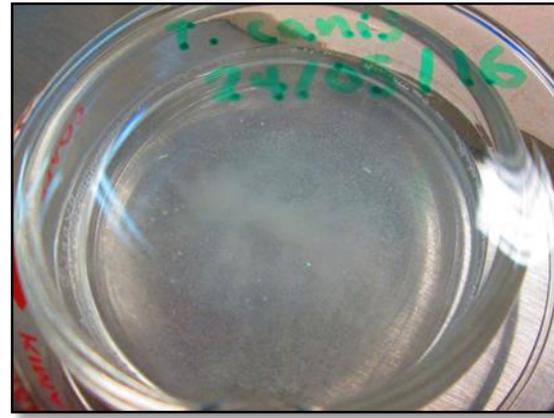
Fig. 4 (A, B). Colección de adultos. A, adultos y material orgánico. B, adultos lavados.

Extracción de huevos de *Toxocara canis*

Luego de la obtención de los especímenes, los nematodos tanto juveniles como adultos, machos y hembras, fueron identificados de acuerdo a las características morfológicas distintivas, separando a las hembras adultas (Hrckova *et al.*, 2001). Las hembras se lavaron con cloro comercial al 1%, manteniéndose en cajas de Petri con SSF durante 12 horas. La obtención de huevos fue realizada de acuerdo al método tradicional descrito por Savigny (1975) (Fig. 5).



A



B

Fig. 5 (A, B). A, diferenciación de nematodos hembras juveniles y adultas. B, huevos colectados.

Estandarización de técnicas usadas para la maduración de huevos de *T. canis*

Fueron evaluados 2 medios de cultivo para la maduración de huevos de *T. canis*:

- a. Hidróxido de sodio (NaOH) al 1% (CTR Scientific)
 - i. NaOH (escamas): 4 gr
 - ii. Agua destilada: 1,000 ml
- b. Solución salina fisiológica (SSF) (Solución CS® PiSA)
 - i. Cloruro de sodio: 0.9 gr
 - ii. Agua inyectable: 100 ml

Ambos medios fueron usados bajo las mismas condiciones de laboratorio: temperatura ambiente (24°C), durante 21 a 25 días, en cajas de cultivo que contenían 1,000±100 huevos por tratamiento. La cantidad de inicio de las soluciones fue 10 ml para ambos medios, mismas que fueron repuestas paulatinamente de acuerdo a su consumo.

Criterios de viabilidad para nematodos, previo a la exposición a los tratamientos

La viabilidad de los huevos fue determinada de acuerdo a las técnicas descritas a continuación:

- a. Lote aceptable de 83% ±4.5 de huevos larvados (Oaks and Kayes, 1979).
- b. Interacción de MTT como método de viabilidad para L2 de *Toxocara canis*

Fue realizado el ensayo de viabilidad con la técnica de MTT (Affymetrix®/USB, ThermoFisher Scientific). El compuesto fue preparado usando 25 mg de MTT por 5 ml de agua estéril destilada y protegido de la luz al estar envuelto por papel aluminio. Fueron realizados 4 ensayos, con grupos de 100 HTc vivos en SSF por cada ensayo a diferente temperatura, a excepción de la prueba con huevos inactivados, que solo contenía 50 HTc. (Tabla 1).

| Protocolo | Variables | |
|--|-------------|---------|
| | Temperatura | Tiempo |
| 100 L2 HTc + 20 µl MTT+ Incubadora | 37° | 2 horas |
| 100 L2 HTc + 20 µl MTT + Incubadora | 32° | |
| 100 L2 HTc + 20 µl MTT | 20°* | |
| 50 L2 HTc (inactivados) + 20 µl MTT + Incubadora | 27° | |

Tabla 1. Protocolos usados para evaluar actividad biológica de MTT.

*Temperatura ambiente

*Inactivados: deshidratados durante 7 días en incubadora a 37°

Origen de los tratamientos

Los compuestos metálicos de transición y ligandos derivados de azoles (Tabla 2, fig. 6 y fig. 7) fueron sintetizados y proporcionados por el Dr. John Jady Hurtado Belancázar y colaboradores, adscritos al Departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes, en Bogotá, Colombia.

| Compuesto | Código / índice |
|---|---------------------|
| dicloro[3,5-bis(3,5-dimetilpirazol-1-ilmetil)tolueno-NN]cobre | DMTCu ²⁺ |
| 3,5-bis(3,5-dimetilpirazol-1-ilmetil)tolueno | DMT |
| dicloro[1,3-bis(indazol-1-ilmetil)benceno-NN]cobre | BIBCu ²⁺ |
| 1,3-bis(indazol-1-ilmetil)benceno | BIB |
| dicloro[bis(3,5-dimetil-1-pirazolil)metano-NN]fierro | Fe |
| bis(3,5-dimetil-1-pirazolil)metano | L1 |

Tabla 2. Compuestos metálicos de transición y ligandos derivados de azoles.

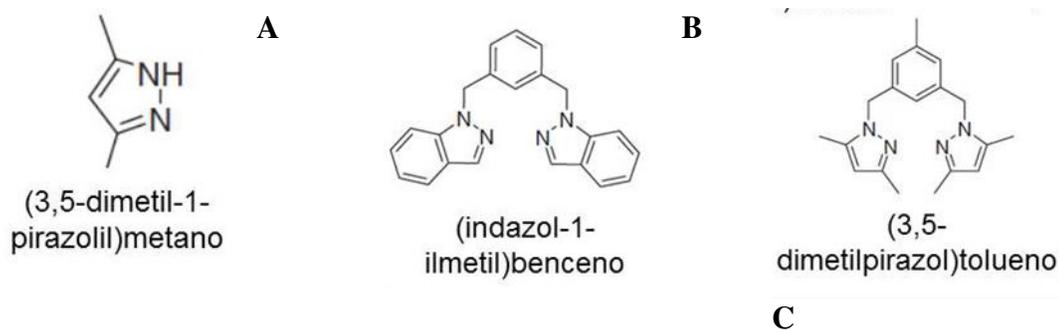


Fig. 6 (A, B, C). Derivados de azoles. A, L1. B, BIB. C, DMT

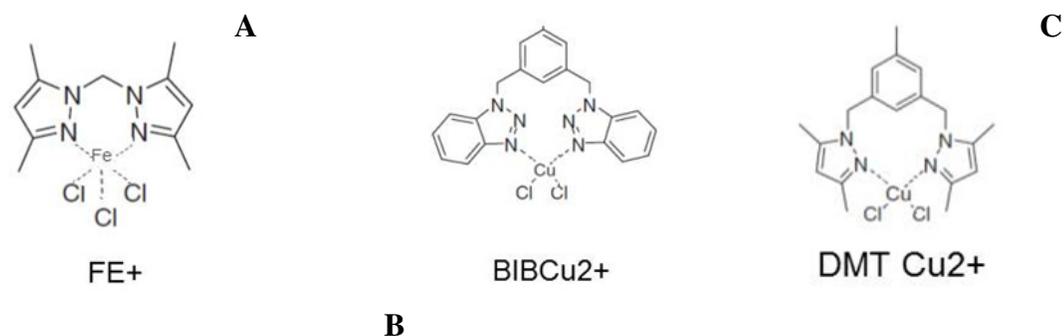


Fig. 7 (A, B, C). Compuestos metálicos con ligandos derivados de azoles. A, Fe⁺. B, BIBCu²⁺. C, DMTCu²⁺.

La SSO con pH neutro (Soluvet ®) fue proporcionado por la casa fabricante Esteripharma México S. A. de C. V. al Hospital Veterinario de Pequeñas Especies de la FMVZ-UANL, que tiene como fórmula agua con pH neutro y especies activas de cloro al 0.006% y oxígeno.

Exposición a los tratamientos

El grupo inicial de huevos fue contabilizado a través de la técnica de Mc Master, evaluando 0.4 ml del cultivo de huevos larvados de *T. canis* expuestos al medio de SSF, determinando que el grupo inicial contenía un aproximado de $73,000 \pm 1,000$ huevos, con un 85% de desarrollo larvario.

La muestra fue homogenizada y dividida en 13 tubos Eppendorf con SSF para facilitar su manipulación, ajustando el contenido de cada tubo a $5,000 \pm 100$ huevos por tubo.

Los ligandos y sus complejos metálicos fueron diluidos con dimetil sulfóxido (DMSO) (Tabla 3), ajustados a la molaridad de 3.9 mM, mientras que el producto Soluvet® fue usado de acuerdo a las instrucciones del fabricante para desinfección de alto nivel o esterilización en frío, es decir, sin dilución.

| Compuesto | Peso molecular | Cantidad (mg) | DMSO (µl) | Concentración (mM) |
|---------------------|----------------|---------------|-----------|--------------------|
| DMTCu ²⁺ | 442.8750 | 2.7 | 1,525 | 3.9 |
| DMT | 304.4300 | 2.8 | 2,300 | |
| BIBCu ²⁺ | 472.8600 | 2.5 | 1,322 | |
| BIB | 338.4100 | 2.6 | 1,920 | |
| Fe | 366.4720 | 2.5 | 1,705 | |
| L1 | 204.2800 | 2.8 | 3,427 | |

Tabla 3. Preparación de compuestos metálicos de transición y ligandos derivados de azoles.

De acuerdo a la exposición natural aproximada de la población canina, elegimos la dosis con 100 huevos larvados por tratamiento para la realización del ensayo *in vitro* (Overgaauw, 1997).

Fueron utilizados grupos de 100 ± 5 huevos larvados (L2), en una placa microtituladora de fondo plano con 96 pocillos. El comportamiento previo al ensayo fue observado durante 1 hora bajo microscopio óptico para garantizar el estado óptimo del grupo.

Todos los ensayos fueron repetidos tres veces por tratamiento, con grupos controles de DMSO, SSF y Febendazol.

Las muestras fueron observadas en periodos de 2 y 4 horas, bajo microscopio invertido Axiovert 40C (Carl Zeiss, Alemania), y evaluadas de acuerdo al criterio de motilidad establecido por Kiuchi *et al.* (1987) y mejorado por Reis *et al.* (2010) (Tabla 4), el cual indica que el valor que corresponde a la escala 5 de motilidad hace referencia al movimiento rápido usando todo el cuerpo, es decir, cuando el tratamiento no tuvo un efecto sobre la motilidad de L2 de *T. canis*.

| Estado de la larva | Escala |
|---|--------|
| Movimiento rápido usando todo el cuerpo | 5 |
| Movimiento intermedio usando todo el cuerpo | 4 |
| Movimiento lento usando todo el cuerpo | 3 |
| Movimiento usando solo una parte del cuerpo | 2 |
| Inmóvil pero no muerta | 1 |
| Muerta | 0 |

Tabla 4. Escala de motilidad

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos fue realizado mediante el paquete estadístico IBM SPSS Statistics v. 23, para llevar a cabo un análisis de varianza ($P < 0.005$).

RESULTADOS

Estandarización de técnicas usadas para la maduración de huevos de *T. canis*, de acuerdo al procedimiento descrito por Oaks and Kayes (1979).

De acuerdo a la evaluación de dos protocolos de cultivos (Fig. 8 A y B) sobre la maduración de huevos, bajo el criterio de Oaks and Kayes (1979), resultó que el grupo de *H7c* cultivados en SSF, desarrolló la mayor cantidad de huevo larvados bajo condiciones de laboratorio ($\pm 83\%$ de lote aceptable de huevos larvados), comparado con el medio a base de NaOH al 1% ($\pm 20\%$ de lote aceptable de huevos larvados), durante 21 a 25 días.

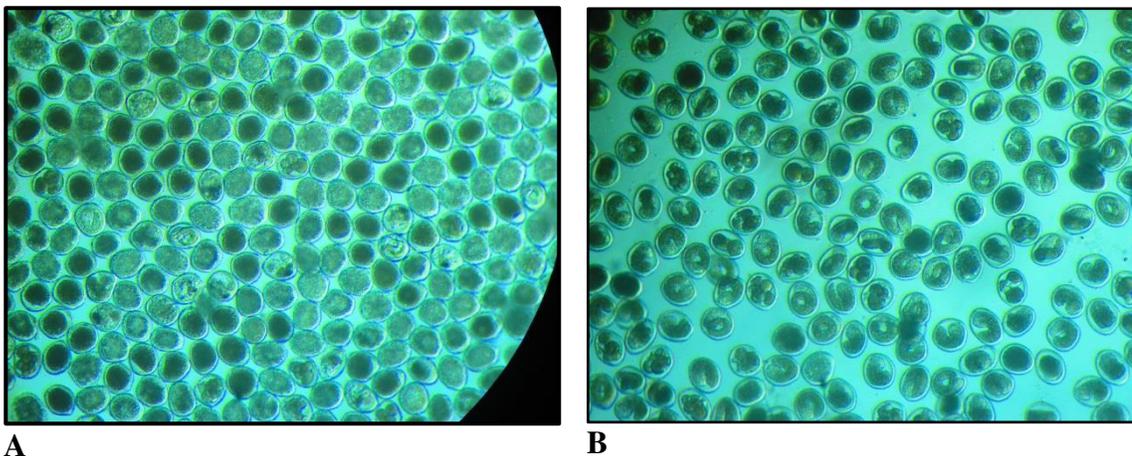


Fig. 8 (A, B). A, grupo de HTc con medio NaOH. B, grupo de HTc con SSF.

Criterios de viabilidad para nematodos, previo a la exposición a los tratamientos

Se realizó el ensayo de viabilidad con la técnica de MTT (Affymetrix®, ThermoFisher Scientific) utilizado usualmente para evaluar la actividad metabólica de células animales. La preparación del compuesto fue realizada usando 25 mg de MTT por 5 ml de agua estéril destilada, sin verse afectada su función biológica. Se expusieron 1 grupo de 100 HTc, con diferente temperatura (Tabla 5).

| Protocolo | Observaciones | |
|--|---------------|-----------|
| | Coloración | Motilidad |
| 100 L2 HTc + 20 µl MTT+ Incubadora | + | + |
| 100 L2 HTc + 20 µl MTT + Incubadora | - | + |
| 100 L2 HTc + 20 µl MTT | - | + |
| 50 L2 HTc (inactivados) + 20 µl MTT + Incubadora | + | - |

Tabla 5. Resultado de reacción de óxido-reducción de cristales de formazán y su efecto en la motilidad de HTc, observado bajo microscopio óptico

*Inactivados: deshidratados durante 7 días en incubadora a 37°

Exposición a tratamientos

El grupo de HTc que fue expuesto al compuesto a base de BIBCu²⁺ fue el que presentó mayor daño respecto a la estructura del huevo (Figura 9), sin embargo, el 81% de las larvas presentaban movimiento intermedio-lento usando el cuerpo completo, es decir, escala 3. (Tabla 6).

En los ensayos con DMT, BIB, Fe²⁺, L1 y Soluvel®, no se observaron cambios morfológicos significativos en la estructura del huevo, además que el 83% de las larvas presentaban de movimiento intermedio-lento a rápido usando todo el cuerpo (escala 3, 4 y 5).

| Tratamiento | Escala | | | | | | Significancia Estadística* |
|---------------------|--------|-------|-------|------|------|---|----------------------------|
| | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 | 0 | |
| Febendazol | 1 | 1 | 1 | 94 | 1 | 0 | |
| DMTCu ²⁺ | 0.33 | 34.66 | 58.33 | 9.66 | 0.33 | 0 | .379 |
| DMT | 90.33 | 6.00 | 3.66 | 0 | 0 | 0 | .897 |
| BIBCu ²⁺ | 5.66 | 7.66 | 81.00 | 5.66 | 0 | 0 | .883 |
| BIB | 87.66 | 9.00 | 3.33 | 0 | 0 | 0 | .895 |
| Fe | 86.66 | 9.66 | 3.66 | 0 | 0 | 0 | .916 |
| L1 | 88.33 | 3.66 | 3.00 | 5.00 | 0 | 0 | .899 |
| Soluvel® | 84.33 | 7.66 | 7.00 | 1.00 | 0 | 0 | .009 |

Tabla 6. Resultados de acuerdo a escala de motilidad y su significancia estadística



A 40x



B 40x

Fig. 9 (A, B) BIBCu²⁺. A, se observa alteración de las capas del huevo y reducción notoria del grosor. B, huevo sin desarrollo larvario con salida del contenido por alteración de las capas.

El grupo expuesto al compuesto formado por DMTCu²⁺ fue observado el adelgazamiento considerable de las capas externas (fig. 10), sin embargo, el 93% de las

larvas presentaban movimiento intermedio-lento usando el cuerpo completo, es decir, escala 3 y 4. (Tabla 6).

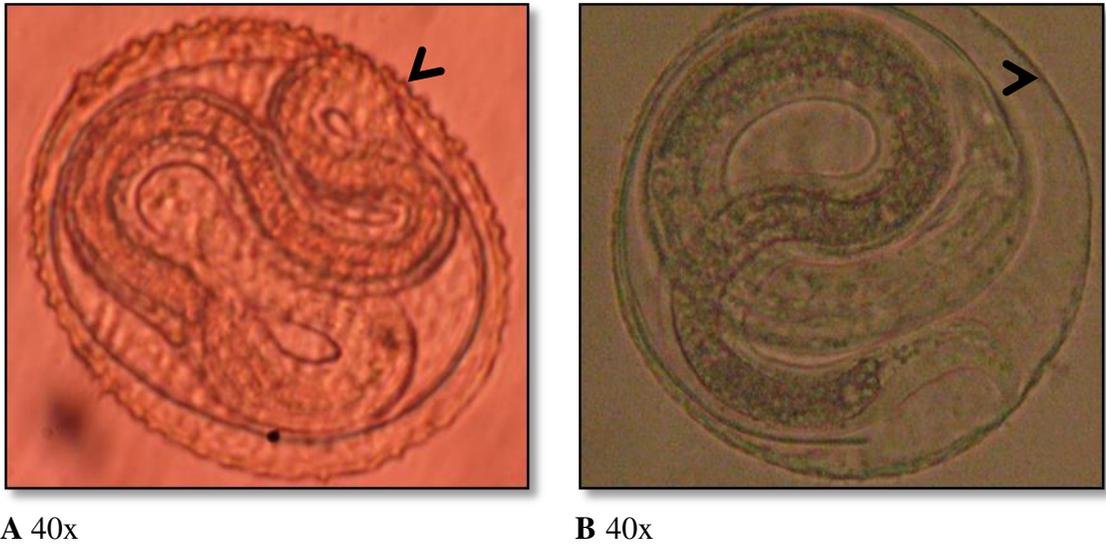


Fig. 10 (A, B). A, huevo de grupo control (SSF) con integridad de capas; nótese la capa granular externa intacta con desarrollo larvario. B, huevo con alteración en capas a pesar de tener desarrollo larvario (DMTCu²⁺).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos respecto al desarrollo larvario y maduración de huevos de *T. canis* utilizando como medio de cultivo SSF, pueden ser atribuidos a que es una solución isotónica, estéril, carente de propiedades tóxicas para cualquier organismo, que mantiene a las células en un nivel bajo de estrés y en constante hidratación, coincidente con el protocolo usado por Heuer *et al* (2015), en el que usaron agua de grifo, en una incubadora a 25° durante un periodo de 4 a 6 semanas.

En cambio, las propiedades atribuibles al NaOH como la capacidad de hidrolizar las proteínas, lo convierte en un posible medio de cultivo nocivo para el desarrollo larvario de los HTc, mismos que están compuestos por glucolípidos y proteínas.

Los métodos tradicionales para la evaluación de la viabilidad de nematodos, incluyen el desarrollo del huevo hasta la etapa larvaria, considerado así como huevo viable o infectivo durante el periodo de incubación, criterio que coincide con otros protocolos, como el seguido por Johnson y colaboradores (1998).

El MTT es un compuesto usado en pruebas de viabilidad de células eucariotas, ya que facilita la identificación de las células metabólicamente activas o viables, convirtiendo el sustrato a un producto fluorescente color morado que puede ser observado a simple vista, pero para una medición menos subjetiva, se requiere la medición a través de un fotómetro de microplacas (Sittampalam *et al.*, 2004). *T. canis* es un organismo multicelular, con capas selectivamente permeables, lo que nos hizo considerar el uso de MTT como método confiable de viabilidad, sin embargo, los resultados no fueron concluyentes debido a que tanto los huevos viables (larva en movimiento) como no viables (larva sin movimiento) presentaban el cambio de coloración correspondiente a las células metabólicamente activas. Adicionalmente, los huevos no viables, fueron deshidratados y rehidratados, para asegurar la pérdida de actividades biológicas y observados bajo microscopio óptico durante 60 minutos previo a la exposición del MTT. Actualmente, existen algunos parámetros que son considerados factores importantes que pudieran alterar la señal (coloración) generada, como la concentración de MTT, el periodo de incubación, el número de células viables y su actividad metabólica. Existen diversos métodos de evaluación que ofrecen mayor certeza sobre la viabilidad de la muestra usada en los ensayos, destacando la de Ferreira *et al.* (2015), quienes obtuvieron resultados positivos con la técnica basada en marcadores fluorescentes como Sytox® y yoduro de propidio, siendo técnicas menos subjetivas, económicas y reproducibles.

Coincidente con el trabajo de investigación realizado por Castillo y colaboradores (2016), los ligandos derivados de azoles, por sí solos, no alteraron las estructuras del organismo. Así mismo, se tiene claro que derivados de pirazol, imidazol e indazol combinados con metales tienen un potencial antibacterial contra bacterias gram positivas y gram negativas, además de especies de hongos resistentes como *Aspergillus fumigatus*. Cabe destacar que el cobre es un elemento esencial para la mayoría de los organismos vivos. Para algunas enzimas, el cobre funciona como un donador/aceptor de electrones, alterando la función biológica celular (Karlin, 1993).

El estrato ascarosideo, característico de los nematodos, está compuesto químicamente por proteínas (25%) y lípidos (75%), haciéndolo impermeable a diferentes compuestos, mejorando la resistencia a condiciones desfavorables (Katakam *et al.*, 2014).

Soluvet® tiene como componente activo el Cl (60 ppm). Ayçiçek y colaboradores (2001) evaluaron la eficacia de algunos desinfectantes, entre ellos el hipoclorito de sodio al 7%, mostrando un 100% de motilidad larvaria 24 horas después de la exposición, concluyendo que el hipoclorito de sodio no tuvo efectos sobre los huevos de *T. canis*, coincidente con los resultados mostrados en este estudio.

Debido a las características estructurales de las membranas uterina, vitelina, quitinosa, granular y laminar convierte al huevo de *Toxocara canis* en un organismo resistente a diferentes condiciones ambientales y agentes químicos (Bouchet *et al.*, 1986).

CONCLUSIÓN

- a) El medio de cultivo a base de SSF demostró ser más eficaz para promover la maduración de huevos bajo condiciones de laboratorio.
- b) El protocolo desarrollado por Oaks and Kayes (1979), sigue siendo un método confiable para determinar la viabilidad de huevos de *Toxocara canis*.
- c) El protocolo de evaluación de viabilidad con MTT fue descartado como método confiable bajo observación de microscopio óptico. Es indispensable el uso del equipo adecuado, así como los factores de tiempo de exposición y concentración del compuesto, para considerar fiables los resultados de éste método.
- d) El efecto de los ligandos derivados de azoles con cobre (BIBCu²⁺ y DMTCu²⁺) pueden inducir daño en la morfología y/o viabilidad del huevo de *T. canis*, provocando rupturas y adelgazamiento de sus membranas. Además, disminuyó considerablemente la motilidad de la larva.
- e) Los derivados de azoles y la solución de superoxidación (Soluvet®) no tuvieron un efecto significativo en el daño de las capas del huevo de *Toxocara canis*.

Es necesario continuar con investigaciones sobre los efectos de estos compuestos en diferentes condiciones y estadios larvarios (no embrionado), así como las pruebas de citotoxicidad celular.

REFERENCIAS

Ayçiçek, H., Yarsan, E., Sarimehmetođlu, HO., Tanyüksel, M., Girginkardepler, N., Özyurt, M. (2001). Efficacy of some disinfectants on embryonated eggs of *Toxocara canis*. *Turk J Med Sci*, 31:35–39.

Beaver, P. (1962). Toxocarosis (visceral larva migrans) in relation to tropical eosinophilia. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 55, 555-576.

Bouchet, F., Boulard, Y., Baccain, D., & Leger, N. (1986). Ultrastructural studies of alterations induced by microwaves in *Toxocara canis* eggs: prophylactic interest. *Zeitschrift for Parasitenkunde Parasitology Research*, 72(6), 755-764. doi:10.1007/bf00925096

Buijs, J., Borsboom, G., Gemund, J. J., Hazebroek, A., Dongen, P. A., Knapen, F. V., & Neijens, H. J. (1994). *Toxocara* Seroprevalence in 5-Year-Old Elementary Schoolchildren: Relation with Allergic Asthma. *American Journal of Epidemiology*, 140(9), 839-847. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a117332

Buijs, J., Borsboom, G., Renting, M., Hilgersom, W., Wieringen, J. V., Jansen, G., & Neijens, J. (1997). Relationship between allergic manifestations and *Toxocara* seropositivity: a cross-sectional study among elementary school children. *European Respiratory Journal*, 10(7), 1467-1475. doi:10.1183/09031936.97.10071467

Castillo, K. F., Bello-Vieda, N. J., Nuñez-Dallos, N. G., Pastrana, H. F., Celis, A. M., Restrepo, S., Ávila, A. G. (2016). Metal Complex Derivatives of Azole: a Study on Their Synthesis, Characterization, and Antibacterial and Antifungal Activities. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. doi:10.5935/0103-5053.20160130

Chen, J., Zhou, D., Nisbet, A. J., Xu, M., Huang, S., Li, M., Wang, C. R., Zhu, X. (2012). Advances in molecular identification, taxonomy, genetic variation and diagnosis

of *Toxocara* spp. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(7), 1344-1348.
doi:10.1016/j.meegid.2012.04.019

Choi, D., Lim, J. H., Choi, D., Paik, S. W., Kim, S., & Huh, S. (2008). Toxocariasis and Ingestion of Raw Cow Liver in Patients with Eosinophilia. *The Korean Journal of Parasitology*, 46(3), 139. doi:10.3347/kjp.2008.46.3.139

Cordero del Campillo, M., & Rojo Vazquez, F. A. (1999). *Parasitología veterinaria*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.

Despommier, D. (2003). Toxocariasis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology, and Molecular Aspects. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(2), 265-272. doi:10.1128/cmr.16.2.265-272.2003

Deutz, A., Fuchs, K., Auer, H., Kerbl, U., Aspöck, H., & Köfer, J. (2005). Toxocara-infestations in Austria: a study on the risk of infection of farmers, slaughterhouse staff, hunters and veterinarians. *Parasitology Research*, 97(5), 390-394. doi:10.1007/s00436-005-1469-5

Ditgen, D., Anandarajah, E. M., Meissner, K. A., Brattig, N., Wrenger, C., & Liebau, E. (2014). Harnessing the Helminth Secretome for Therapeutic Immunomodulators. *BioMed Research International*, 2014, 1-14. doi:10.1155/2014/964350

Durán, H. (2010). Soluciones de superoxidación y su evolución tecnológica. *Revista Dolor*, 3, 4-8.

Eftekhari-zadeh, F., Dehnavieh, R., Noori Hekmat, S., & Mehroolhassani, M. H. (2016). Health technology assessment on super oxidized water for treatment of chronic wounds. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*, 30, 384.

ESCCAP. (2017, July). ESCCAP Guideline 01 2nd edition Worm Control in Dogs and Cats. Recuperado el 21 de septiembre de 2017, desde <http://www.esccap.org/>

Ferreira, S. R., Mendes, T. A., Bueno, L. L., Araújo, J. V., Bartholomeu, D. C., & Fujiwara, R. T. (2015). A New Methodology for Evaluation of Nematode Viability. *BioMed Research International*, 2015, 1-7. doi:10.1155/2015/879263

Filho, F. A., Chieffi, P. P., Correa, C. R., Camargo, E. D., Silveira, E. P., Aranha, J. J., & Ribeiro, M. C. (2002). Human toxocariasis: a seroepidemiological survey in the municipality of Campinas (SP), Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 44(6), 303-307. doi:10.1590/s0036-46652002000600002

Finch, G., Black, E., Labatiuk, C., Guyrek, L., & Beloseciv, M. (1993). Comparison of *Giardia lamblia* and *Giardia muris* cyst inactivation by ozone. *Applied Environmental Microbiology*, 59, 3674-3680.

Goodwin, C., Holt, S., Downes, S., & Marshall, N. (1995). Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. *Journal of Immunological Methods*, 179(1), 95-103. doi:10.1016/0022-1759(94)00277-4

Heuer, L., Haendel, S., Beineke, A., & Strube, C. (2015). Effects of *Toxocara* larvae on brain cell survival by in vitro model assessment. *Parasitology*, 142(10), 1326-1334. doi:10.1017/s0031182015000694

Hrckova, G., Velebny, S., Tomasovicova, O., Medvedova, M., Pajersky, A. (2001). Pathological changes in mice infected with *Toxocara cati* following administration of fenbendazole and glucan. *Acta Parasitol.* 46:313–320

Johnson, P., Dixon, R., & Ross, A. (1998). An in-vitro test for assessing the viability of *Ascaris suum* eggs exposed to various sewage treatment processes. *International Journal for Parasitology*, 28(4), 627-633. doi:10.1016/s0020-7519(97)00210-5

Kamiya, M., Ooi, H., & Nomura, T. (1987). The effect of radiation on the viability and migratory ability of second-stage larvae of *Toxocara canis* in mice. *Veterinary Parasitology*, 24(1-2), 87-92. doi:10.1016/0304-4017(87)90133-6

Karlin, K. (1993). Metalloenzymes, structural motifs, and inorganic models. *Science*, 261(5122), 701-708. doi:10.1126/science.7688141

Katakam, K. K., Mejer, H., Dalsgaard, A., Kyvsgaard, N. C., & Thamsborg, S. M. (2014). Survival of *Ascaris suum* and *Ascaridia galli* eggs in liquid manure at different ammonia concentrations and temperatures. *Veterinary Parasitology*, 204(3-4), 249-257. doi:10.1016/j.vetpar.2014.05.017

Kong, J., Won, J., Yoon, J., Lee, U., Kim, J., & Huh, S. (2016). Draft Genome of *Toxocara canis*, a Pathogen Responsible for Visceral Larva Migrans. *The Korean Journal of Parasitology*, 54(6), 751-758. doi:10.3347/kjp.2016.54.6.751

Macpherson, C. N. (2013). The epidemiology and public health importance of toxocarosis: A zoonosis of global importance. *International Journal for Parasitology*, 43(12-13), 999-1008. doi:10.1016/j.ijpara.2013.07.004

Magaña-López, R., Luna-Pabello, V., Barrera-Godínez, J., Velásquez, M. O., & Fernández-Villagómez, G. (2016). Effect of mineral aggregates on the morphology and viability of *Toxocara canis* eggs. *Ecological Engineering*, 90, 125-134. doi:10.1016/j.ecoleng.2016.01.071

Magnaval, J., Glickman, L. T., Dorchie, P., & Morassin, B. (2001). Highlights of human toxocarosis. *The Korean Journal of Parasitology*, 39(1), 1. doi:10.3347/kjp.2001.39.1.1

Maizels, R. M. (2013). *Toxocara canis*: Molecular basis of immune recognition and evasion. *Veterinary Parasitology*, 193(4), 365-374. doi:10.1016/j.vetpar.2012.12.032

Mizgajska-Wiktor, H., & Uga, S. (2016). Exposure and environmental contamination. In *Toxocara: The Enigmatic Parasite* (pp. 211-227). Oxfordshire, UK: CABI Publishing.

Mizgajska-Wiktor, H., Jarosz, W., Fogt-Wyrwas, R., & Drzewiecka, A. (2017). Distribution and dynamics of soil contamination with *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs in Poland and prevention measures proposed after 20 years of study. *Veterinary Parasitology*, 234, 1-9. doi:10.1016/j.vetpar.2016.12.011

Moreira, G., Telmo, L. P., Mendonca, M., Moreira, A., McBride, A., Scaini, C., & Conceicao, F. (2014). Human toxocariasis: current advances in diagnostics, treatment, and interventions. *Trends Parasitology*, 30, 456-464.

Morgan, E., Azam, D., & Pegler, K. (2013). Quantifying sources of environmental contamination with *Toxocara* spp. eggs. *Veterinary Parasitology*, 193(4), 390-397. doi:10.1016/j.vetpar.2012.12.034

Mun, S., Cho, S., Kim, T., Oh, B., & Yoon, J. (2009). Inactivation of *Ascaris* eggs in soil by microwave treatment compared to UV and ozone treatment. *Chemosphere*, 77(2), 285-290. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.07.030

Negm, N., Zaki, M., & Salem, M. (2010). Cationic schiff base amphiphiles and their metal complexes: Surface and biocidal activities against bacteria and fungi. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 77(1), 96-103. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.01.012

Núñez, C. R., Martínez, G. D., Arteaga, S. Y., Macotela, M. P., Montes, P. B., & Durán, N. R. (2013). Prevalence and Risk Factors Associated with *Toxocara canis* Infection in Children. *The Scientific World Journal*, 2013, 1-4. doi:10.1155/2013/572089

- Oaks, J. A., & Kayes, S. G. (1979). Artificial Hatching and Culture of *Toxocara canis* Second Stage Larvae. *The Journal of Parasitology*, 65(6), 969. doi:10.2307/3280259
- Overgaauw, P. A., & Knapen, F. V. (2013). Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. *Veterinary Parasitology*, 193(4), 398-403. doi:10.1016/j.vetpar.2012.12.035
- Overgaauw, P. A., & Nederland, V. (1997). Aspects of *Toxocara* Epidemiology: Toxocarosis in Dogs and Cats. *Critical Reviews in Microbiology*, 23(3), 233-251. doi:10.3109/10408419709115138
- Owen, W. (1930). Factors that influence the development and survival of the ova of an ascarid roundworm, *Toxocara canis* under field conditions. *Technical Bulletin of Minnesota Agricultural Experiment Station*. 71, 25.
- Parise, M. E., Slutsker, L., & Hotez, P. J. (2014). Neglected Parasitic Infections in the United States: Needs and Opportunities. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(5), 783-785. doi:10.4269/ajtmh.13-0727
- Parsons, J. C. (1987). Ascarid Infections of Cats and Dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 17(6), 1307-1339. doi:10.1016/s0195-5616(87)50004-3
- Pawlowski, Z. (2001). Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. *Journal of Helminthology*, 75(04), 299-305. doi:10.1017/s0022149x01000464
- Reis, M., Trinca, A., Ferreira, M. J., Monsalve-Puello, A. R., & Grácio, M. A. (2010). *Toxocara canis*: Potential activity of natural products against second-stage larvae in vitro and in vivo. *Experimental Parasitology*, 126(2), 191-197. doi:10.1016/j.exppara.2010.04.023

Resende, N. M., Gazzinelli-Guimarães, P. H., Barbosa, F. S., Oliveira, L. M., Nogueira, D. S., Gazzinelli-Guimarães, A. C., Gonçalves, M. T., Amorim, C. C., Oliveira, F. M., Caliari, M. V., Rachid, M. A., Volpato, G. T., Bueno, L. L., Geiger, S. M., and Fujiwara, R. T. (2015). New insights into the immunopathology of early *Toxocara canis* infection in mice. *Parasites & Vectors*, 8(1). doi:10.1186/s13071-015-0962-7

Roddie, G., Stafford, P., Holland, C., & Wolfe, A. (2008). Contamination of dog hair with eggs of *Toxocara canis*. *Veterinary Parasitology*, 152(1-2), 85-93. doi:10.1016/j.vetpar.2007.12.008

Rodríguez-Vivas, R. I., Gutierrez-Ruiz, E., Bolio-González, M. E., Ruiz-Piña, H., Ortega-Pacheco, A., Reyes-Novelo, E., Marique-Saide, P., Aranda-Cicerol, F., Lugo-Perez, J. (2011). An Epidemiological Study of Intestinal Parasites of Dogs from Yucatan, Mexico, and Their Risk to Public Health. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(8), 1141-1144. doi:10.1089/vbz.2010.0232

Roundworms in Small Animals - Digestive System. (n.d.). Recuperado el 21 de septiembre de 2017, desde <http://www.msdevetmanual.com/digestive-system/gastrointestinal-parasites-of-small-animals/roundworms-in-small-animals>

S., S. L., & Camberos, L. O. (2006). *Farmacología veterinaria*. México: MacGraw-Hill Interamericana.

Satou, T., Akao, N., Matsushashi, R., Koike, K., Fujita, K., & Nikaido, T. (2002). Inhibitory Effect of Isoquinoline Alkaloids on Movement of Second-Stage Larvae of *Toxocara canis*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 25(12), 1651-1654. doi:10.1248/bpb.25.1651

Savigny, D. H. (1975). In vitro Maintenance of *Toxocara canis* Larvae and a Simple Method for the Production of *Toxocara* ES Antigen for Use in Serodiagnostic Tests for Visceral Larva Migrans. *The Journal of Parasitology*, *61*(4), 781. doi:10.2307/3279492

Schnieder, T., Laabs, E., & Welz, C. (2011). Larval development of *Toxocara canis* in dogs. *Veterinary Parasitology*, *175*(3-4), 193-206. doi:10.1016/j.vetpar.2010.10.027

Shalaby, H., Shafy, S. A., Ashry, H., & Moghazy, F. E. (2011). Efficacy of Hydrogen Peroxide and Dihydroxy Benzol Mixture (Disinfectant) on *Toxocara canis* Eggs. *Research Journal of Parasitology*, *6*(4), 144-150. doi:10.3923/jp.2011.144.150

Sittampalam, G. S. (2004). Assay Guidance Manual. Recuperado el 21 de septiembre de 2017, desde <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/>

Smith, H., & Noordin, R. (n.d.). Diagnostic limitations and future trends in the serodiagnosis of human toxocariasis. *Toxocara: the enigmatic parasite*, 89-112. doi:10.1079/9781845930264.0089

Taira, K., Saeed, I., Permin, A., & Kapel, C. (2004). Zoonotic risk of *Toxocara canis* infection through consumption of pig or poultry viscera. *Veterinary Parasitology*, *121*(1-2), 115-124. doi:10.1016/j.vetpar.2004.01.018

Tanaka, H., Hirakata, Y., Kaku, M., Yoshida, R., Takemura, H., Mizukane, R., Kamihira, S. (1996). Antimicrobial activity of superoxidized water. *Journal of Hospital Infection*, *34*(1), 43-49. doi:10.1016/s0195-6701(96)90124-3

Zhu, X., Korhonen, P. K., Cai, H., Young, N. D., Nejsun, P., Samson-Himmelstjerna, G. V., Gasser, R. B. (2015). Genetic blueprint of the zoonotic pathogen *Toxocara canis*. *Nature Communications*, *6*, 6145. doi:10.1038/ncomms7145

Zibaei, M., Sadjjadi, S., Jahadi-Hosseini, S., & Sarkari, B. (2007). A method for accelerating the maturation of *Toxocara cati* eggs. *Iranian Journal of Parasitology*, 2, 39-42.