

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMIA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



EVALUACIÓN *in vitro* DE COMPLEJOS CON METALES DE TRANSICION DERIVADOS DE LIGANDOS AZOLES SOBRE HUEVOS EMBRIONADOS DE *Toxocara canis*

Por

MVZ. LUCIO HERNÁNDEZ SOBERANIS

Como requisito parcial para obtener el Grado de

MAESTRO EN CIENCIA ANIMAL

Junio, 2018

EVALUACIÓN *in vitro* DE COMPLEJOS CON METALES DE TRANSICION DERIVADOS DE LIGANDOS AZOLES SOBRE HUEVOS EMBRIONADOS DE *Toxocara canis*

KARINA W. VÁZQUEZ C.

Dra. Karina W. Vázquez Cisneros
Directora de Tesis

Jonh J. Hurtado B.

Co-Director de Tesis
Dr. Jonh J. Hurtado Belalcazar

Diana E. Zamora

Co-Director de Tesis
Dra. Diana E. Zamora Ávila

M. C. Andrea González Báez

Co-Director de Tesis
M. C. Andrea González Báez

Juan J. Zárate

Co-Director de Tesis
Dr. Juan J. Zárate Ramos

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Karina Vazquez por confiar en mi, por permitirme trabajar en este proyecto, por estimularme en cada paso de la maestría y compartirme su entusiasmo en la investigación.

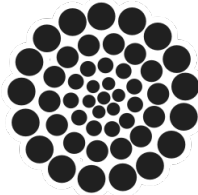
Al Dr. Zarate por sus consejos, asesorías, por permitirnos trabajar en su laboratorio de parasitología y proporcionación de parásitos para la realización de esta investigación.

A la M. C Alejandra Baez por sus consejos y recomendaciones durante la maestría.

A la Dra. Diana Zamora por ser una muy buena maestra, por haber compartido su conocimiento en clases y por las aportaciones de consejos en este proyecto.

Al Dr. Jonh Jady por su colaboración en el proyecto, tanto aportación de materiales como de redacciones, por la unión de dos grandes universidades y por permitirme realizar la estancia en su laboratorio en Bogotá, Colombia.

Un agradecimiento especial a toda la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León por aceptarme en programa de maestría, tan majestuosa institución, a la Universidad de los Andes en Bogotá, Colombia por permitirme realizar la estancia académica y conocer más de los complejos metálicos.



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

DEDICATORIAS

A mis padres, por darme la vida, por apoyarme en el estudio de mi carrera y maestría, por siempre darme todo lo que tuvieron y buscar la forma de darme lo que no tuvieron, por ceder en mi toma de decisiones y dejarme volar alto.

A mis hermanas Denis y Estefania que me solapan y siempre están ahí para escucharme a pesar de vivir tan lejos.

A mis compañeras de maestría Alejandra, Aimé, Kenia, Yuridiana, Claudia y Marcia por hacer el viaje académico tan divertido.

A César, mi compañero de vida, que estuvo en todo momento junto a mi, en la salud y en la enfermedad, que me ha ayudado tanto en mis grandes y malos lapsos, en mis noches de desvelo y angustias de fines de semestre, que me ha tenido tanta paciencia, por tanto apoyo en el vivir en esta gran ciudad, por su comprensión, amor y cariño.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
DEDICATORIAS.....	4
ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES.....	14
2. 1 Enfermedades zoonóticas	14
2. 1. 1 Zoonosis Parasitarias.....	15
2. 1. 2 <i>Toxocara canis</i>	16
2. 1. 3 Clasificación taxonómica.....	17
2. 1. 4 El ciclo de vida <i>Toxocara canis</i> en el huésped definitivo	18
2. 1. 5 El ciclo de vida <i>Toxocara canis</i> en humanos.....	19
2. 1. 6 Huevos de <i>Toxocara canis</i>	22
2. 1. 7 Epidemiología de <i>T. canis</i>	24
2. 1. 7 Tratamientos convencionales.....	26
2. 2 Los Metales en la Farmacología	27
2. 2. 1 Complejos metálicos	28

3. JUSTIFICACIÓN.....	29
4. HIPÓTESIS.....	30
5. OBJETIVO DEL TRABAJO.....	31
5. 1 Objetivos específicos.....	31
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
6. 1 Muestras biológicas.....	32
6. 2 Complejos metálicos	33
6. 3 Ensayo <i>In vitro</i>	34
6. 3. 1 Criterios de movilidad relativa (MR)	35
6. 4 Toxicidad de los complejos metálicos.....	36
6. 4. 2 Cultivo Celular.....	36
6. 5 Evaluación de la citotoxicidad.....	36
7. RESULTADOS	37
7. 1 Movilidad Relativa.....	37
7. 1. 3 Evaluación de la Toxicidad.....	39
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
9. CONCLUSIONES	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tab. 01 criterios para evaluar el efecto de los compuestos sobre los huevos larvados de Toxocara canis.....	35
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig 01. Característica morfológica de <i>Toxocara canis</i> , es la presencia y forma de las alas cervicales (bridas cuticulares claras que corren a lo largo de los márgenes laterales anteriores del gusano. Fotografía: Universidad de Pensilvania, 2008.....	17
Fig 02. Larva de <i>Toxocara canis</i> en el cerebro de un ratón infectado (Strube et al., 2013.....	19
Fig 03. Ciclo de vida de <i>Toxocara canis</i> (CDC, 2014).....	21
Fig 04. Huevo larvado de <i>T. canis</i> (Departamento de parasitología, UNAM ,2016).....	23
Fig 05. Prevalencias y los rangos de tamaño de muestra (número de individuos examinados), cada punto amarillo con un halo azul representa una encuesta nacional definida (Guangxu et al., 2017).....	25
Fig 06. Obtención de hembras grávidas y recolección de huevos Fotografía B: Alejandra Flores (Departamento de Parasitología, FMVZ- UANL, 2016).....	32
Fig 07. Complejos metálicos utilizados en la investigación.....	33
Fig 08. Huevos embrionados de <i>T.canis</i> . Fotografía: LHS.....	34
Fig 09. Movilidad Relativa (MR) de los huevos de <i>Toxocara canis</i> expuestos a las concentraciones y el antihelmíntico estándar Albendazol (ABZ).....	37
Fig 10. Morfología de los parásitos dentro del huevo A) sin exposición a los compuestos, B) exposición a Ls2 (15 μ M) C) antihelmitico estándar ABZ.....	38
Fig 11. Citotoxicidad en hepatocitos de Ls1- Ls5, la figura muestra el porcentaje de viabilidad celular en diferentes concentraciones de los compuestos.....	39

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

HTC	Huevos de <i>Toxocara canis</i>
Co	Cobalto
Ni	Niquel
Cu	Cobre
Zn	Zinc
MR	Movilidad relativa
LMV	Larva migrans visceral
LMO	Larva Migrans Ocular
OMS	Organización Mundial de la Salud
µm	Micro micras
CDC	Centro para el Control y Prevención de Enfermedades
TN	Toxocariosis neurológica
SNC	Sistema Nervioso Central
ABZ	Albendazol

RESUMEN

La Toxocarosis es una enfermedad parasitaria ocasionada por larvas del género *Toxocara*. El parásito *T. canis* es uno de los tres nematodos más prevalentes en los estudios llevados a cabo en zonas urbanas de países como Perú, Argentina y México. Los huevos de *T. canis* (HTC) son altamente resistentes a condiciones ambientales adversas y desinfectantes químicos de uso rutinario. Entre las posibilidades de ayudar en este ámbito se han hecho investigaciones de nuevos fármacos acoplando la actividad biológica de los compuestos azólicos con las propiedades de metales como cobalto (Co), níquel (Ni), cobre (Cu), zinc (Zn) y otros metales de transición. Basado en el gran interés por la destrucción de los HTC, el objetivo de la investigación se enfocó en el uso de complejos metálicos como una alternativa ante esta problemática así como también determinar la posible toxicidad de estos complejos en células de hepatocitos murinos. La actividad nematocida se evaluó en términos de movilidad relativa (MR), mientras que la toxicidad fue evaluada por la técnica de rojo neutro. En los resultados de los ensayos *in vitro* se demostró que los compuestos en general tienen actividad anti-HTCs moderada. La baja motilidad de las larvas y el daño morfológico indicaron que el compuesto Ls2 tenía mayor actividad anti-HTC, además que en los ensayos de la línea celular se determinó que los complejos presentaron nula citotoxicidad.

ABSTRACT

Toxocarosis is a parasitic disease caused by larvae of the genus *Toxocara*. The *T. canis* parasite is one of the three most prevalent nematodes in studies carried out in urban areas of countries such as Peru, Argentina and Mexico. The eggs of *T. canis* (HTC) are highly resistant to adverse environmental conditions and chemical disinfectants for routine use. Among the possibilities to help in this area have been research of new drugs by coupling the biological activity of azo compounds with the properties of metals such as cobalt (Co), nickel (Ni), copper (Cu), zinc (Zn) and others transition metals. Based on the great interest in the destruction of the HTC, the objective of the research focused on the use of metal complexes as an alternative to this problem as well as to determine the possible toxicity of these complexes in murine hepatocyte cells. The nematocidal activity was evaluated in terms of relative mobility (MR), while the toxicity was evaluated by the neutral red technique. The results of the *in vitro* tests showed that the compounds in general have moderate anti-HTC activity. The low motility of the larvae and the morphological damage indicated that the compound Ls2 had greater anti-HTC activity, besides that in the cell line assays it was determined that the complexes had no cytotoxicity.

1. INTRODUCCIÓN

La Toxocarosis es una zoonosis ocasionada por larvas del género *Toxocara*, las dos especies más frecuentemente reconocidas como causantes de esta infección en el ser humano son *Toxocara cati* y *Toxocara canis* (Divyamol et al., 2014; Patricia et al., 2015; Mattos et al., 2016). La última de estas especies ha sido relacionada con mayor frecuencia a infecciones en seres humanos. El parásito *T. canis* es uno de los tres nematodos más prevalentes en los estudios llevados a cabo en zonas urbanas de países como Perú, Argentina y México (Camilo et al., 2013)

Los cachorros contaminan el medio ambiente con grandes cantidades de huevos que pueden embrionarse y volverse infectivos en menos de un mes siendo estos infecciosos para los seres humanos y otros huéspedes paraténicos (Rosypal, 2017). La infección surge cuando accidentalmente un humano ingiere huevos de *Toxocara canis* (HTC), estos eclosionan y las larvas logran penetrar el intestino, logrando viajar por las vénulas mesentéricas y/o torrentes linfáticos siendo transportadas a distintos órganos (Maizels et al., 2000; Judith et al., 2011; Anirt et al., 2012).

Existen tres presentaciones clínicas de la parasitosis por *T. canis* en humanos; Larva migrans visceral (LMV), cuando órganos como el hígado o los pulmones, se ven afectados; Toxocariasis migrans ocular (LMO), cuando el ojo es afectado; y Toxocariasis encubierta o común, cuando los síntomas son leves y no específicos.

El daño hepático y pulmonar son las complicaciones clínicas más comúnmente descritas en los pacientes; Otras manifestaciones menos comunes de la enfermedad causadas por la infección por *Toxocara* incluyen neurotoxocariasis, meningitis eosinofílica, derrame pericárdico y miocarditis (Woodhall et al. 2014)

Los huevos de *T. canis* son altamente resistentes a condiciones ambientales adversas y desinfectantes químicos de uso rutinario (Ayc ¼c ¼k., 2001; Rosypal., 2017). Entre las posibilidades de ayudar en este ¼mbito se han hecho investigaciones de nuevos f¼rmacos acoplando la actividad biol¼gica de los compuestos az¼licos con las propiedades de metales como cobalto (Co), n¼quel (Ni), cobre (Cu), zinc (Zn) y otros metales de transici¼n, encontr¼ndose propiedades antimicrobianas y antimic¼ticas de los complejos met¼licos con respecto a los azoles libres, el incremento de las propiedades antimicrobianas de estos compuestos se asoci¼ a un aumento en la lipofilicidad farmacol¼gica (Gammal et al, 2015; Keshia et al, 2016)

Basado en el gran inter¼s por la destrucci¼n de los HTC, enfocamos nuestra investigaci¼n en el uso de complejos met¼licos contra huevos de *T. canis* como una alternativa ante esta problem¼tica. Hasta donde sabemos, el uso de complejos derivados de azoles en la evaluaci¼n morfol¼gica y en la viabilidad de HTC a¼n no ha sido reportado. El prop¼sito de la tesis fue evaluar el efecto de diferentes complejos met¼licos sobre la viabilidad de los HTC.

2. ANTECEDENTES

2. 1 Enfermedades zoonóticas

El término de zoonosis fue determinado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1956, a las enfermedades que de carácter natural se puedan transmitir de animales a humanos. Las zoonosis son enfermedades poco conocidas en términos generales por la población, siendo en los países en vías de desarrollo una importante causa de morbimortalidad y pérdidas económicas. esta es propagada entre animales y personas, pudiendo ser causadas por virus, bacterias, parásitos y hongos. Para las zoonosis que son ocasionadas por parásitos, los tipos de síntomas y signos pueden ser diferentes dependiendo del parásito y la persona, pudiendo presentar sintomatología clínica en ocasiones y en otras ser asintomáticos, dificultando el diagnóstico (CDC, 2016; Mattos et al., 2016)

Las enfermedades emergentes, reemergentes y las enfermedades desatendidas, se presentan entre otras causas por el habitamiento a las mismas (Garza 2010), su prevalencia acontece principalmente en poblaciones marginadas, con rezagos en su desarrollo social y económico. Convergiendo en el descuido para atenderlas, ocasionando miles de muertos y millones de enfermos al año.

2. 1. 1 Zoonosis Parasitarias

Las zoonosis parasitarias pueden causar una variedad de síntomas en los seres humanos, desde la irritación de la piel causada por picaduras de pulgas, hasta la muerte por falla multiorgánica, como se observa en la enfermedad avanzada de Lyme. Las zoonosis parasitarias pueden resultar de la ingestión de alimentos que contienen el parásito, como la carne; peces, crustáceos e invertebrados; o por ingestión de la fase infecciosa del gusano con suciedad contaminada.

El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) dictaminó que la Toxocariosis es una de las cinco enfermedades parasitarias más importantes, junto con la enfermedad de Chagas, la neurocisticercosis y la toxoplasmosis (Elsheikha, 2014; Marcal, 2014). Esta enfermedad está generalizada en muchos países, alcanzando una alta prevalencia independientemente de las condiciones económicas. Sin embargo, es probable que se subestime el número real de casos de Toxocariosis debido a la falta de programas adecuados de vigilancia además de los ineficientes métodos de diagnóstico.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha formulado recomendaciones para reducir la transmisión de *Toxocara spp.* a humanos. El principal consejo es limitar la exposición a los suelos contaminados con huevos de *Toxocara spp.*, reduciendo la presencia de heces de perros y gatos infectados, ya que son los huéspedes definitivos y los principales eslabones epidemiológicos en la cadena de la toxocariosis humana (Marcal., 2014)

2. 1. 2 *Toxocara canis*

Toxocara canis (*T. canis*) fue descrito por primera vez por Werner en 1782 y fue nombrado como *Lumbricus canis* (Sprent, 1958). El nematodo *T. canis* es un gusano de prevalencia mundial, parasita perros y diversos cánidos, este parásito corresponde al *phylum Nemátoda*, con cuerpo tubular y no segmentado, que mide entre 5 y 15 cm de longitud, frecuentemente habita en el intestino delgado de canes. La hembra de *T. canis* tiene gran capacidad biótica, ovipone en el intestino de su albergador definitivo (cánidos) aproximadamente 200,000 huevos por día y son expulsados con las deposiciones (Archelli S & Kozubsky L., 2008)

Los adultos *T. canis* presentan dimorfismo sexual, miden de 9 a 18 cm, de color blanco a amarillento, y se encuentran en el intestino delgado de sus hospedadores definitivos, otras características morfológicas distintivas es poseer tres labios, proyecciones de la cutícula llamadas alas cervicales, por el tamaño de las espículas de los machos y los rasgos distintivos del aparato reproductor femenino (De la Fé et al., 2006)

2. 1. 3 Clasificación taxonómica

Dominio: *Eukaryota*

Reino: *Animalia*

Subreino: *Bilateria*

Rama: *Protostomia*

Infrareino: *Ecdysozoa*

Phylum: *Nemathelminthes*

Clase: *Secernentea*

Subclase: *Rhabditia*

Orden: *Ascaridida*

Suborden: *Ascaridina*

Superfamilia: *Ascaridoidea*

Familia: *Toxocaridae*

Genero: *Toxocara*

Especie: *canis*

(De la Fé et al., 2006)



Fig 01. Característica morfológica de *Toxocara canis*, es la presencia y forma de las alas cervicales (bridas cuticulares claras que corren a lo largo de los márgenes laterales anteriores del gusano. Fotografía: Universidad de Pensilvania, 2008.

2. 1. 4 El ciclo de vida *Toxocara canis* en el huésped definitivo

El ciclo de *T. canis* es notablemente complejo comparado con el de otros nematodos (Nicoletti., 2013). La infección de los cachorros es por distintas maneras: ruta transplacentaria provocada por larvas que han estado enquistadas en diversos tejidos de la madre, otra ruta se asocia al consumo de larvas por leche materna y huevos embrionados o por el consumo de tejidos de animales que fungen a modo de reservorios paraténicos de larvas infectivas.

Las larvas infecciosas luego de ser ingeridas son deglutidas y a nivel intestinal inician una migración somática que se inicia cuando atraviesan la pared del duodeno, alcanzando el hígado alrededor de 24 h después de la infección por medio de la circulación portal a través de los capilares venosos. Aproximadamente 12 h más tarde, las larvas continúan el desplazamiento al corazón donde se llega al pulmón por la arteria pulmonar. A partir de allí, la ruta de migración depende de distintos factores, como la edad y estado inmunológico del huésped, así como la dosis infecciosa ingerida. Las larvas pueden penetrar a los alvéolos llevando la ruta de la larva por la faringe mediante los bronquiolos y la tráquea, en donde es deglutida. Los adultos aparecen en su órgano blanco (el intestino delgado) luego de 7-15 días de la migración traqueal (Sprent., 1958).

En el medio ambiente los huevos son diseminados por lluvias, viento y otras cuestiones climáticas permaneciendo infecciosos por meses y algunas veces, durante años. En perros de más de un año, los nemátodos infecciosos permanecen en el tejido y se encapsulan, logrando gracias a diferentes situaciones, reactivarse y pasar por vía trasplacentaria al feto y así al tubo digestivo del cachorro posterior al nacimiento, culminando el ciclo como se muestra en la figura 01.

2. 1. 5 El ciclo de vida *Toxocara canis* en humanos

En humanos el trayecto de la larva es similar a lo que sucede en los cánidos, las larvas viajan al hígado continuando con la ruta portal; seguido por el sistema venoso, entrando al pulmón y circulación sistémica. Las larvas de *T. canis* afectan distintos órganos al igual que en el caso de los caninos y en humanos, siendo los principales ojos, hígado, y casos crónicos cerebro. Un gran porcentaje de contagios asociados a *T. canis* no llegan a presentar síntomas, las larvas logran viajar y ocasionar granulomas en tejido hepático, pulmones, ojos, cerebro y nódulos linfáticos, la cantidad está en porcentaje al número de huevos larvados deglutidos (Delgado et al., 2009)

El cuadro clínico de la toxocariosis en humanos se ha clasificado sistemáticamente en cuatro grupos: síndrome de larva migratoria visceral (LMV), toxocariosis neurológica (TN) (Fig. 02), síndrome de larva migratoria ocular (LMO), que se presenta como la forma más severa de la infección, denotado como la causa de endoftalmitis crónica, retinitis periférica y granuloma retiniano y la toxocariosis encubierta descrita recientemente (Strube et al., 2013).

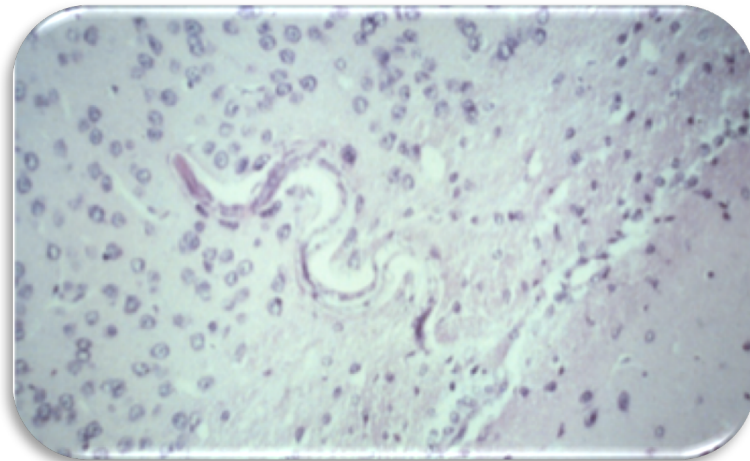


Fig 02. Larva de *Toxocara canis* en el cerebro de un ratón infectado (Strube et al., 2013)

Los HTC eclosionan en intestino delgado donde las larvas liberadas perforan pared del intestino y así pueden ingresar a un vaso sanguíneo, atravesando hígado y pulmones hasta el corazón izquierdo donde se diseminan por circulación sistémica.

En general, el patrón de migración en el huésped paraténico es comparable al del hospedador definitivo. La distribución de las larvas depende en gran medida de las especies infectadas. Comúnmente, las larvas eclosionan después del consumo, penetran en la pared intestinal y durante la llamada fase hepatopulmonar migran a través del sistema circulatorio al hígado y luego a pulmones, posteriormente, persisten con la migración a la circulación sistémica. Durante la fase visceral se distribuyen por todo el cuerpo de acuerdo con los sitios de predilección dependientes de la especie (Sprent., 1952).

Posteriormente pueden llegar a persistir en el tejido de manera latente por largos períodos de tiempo, como larvas encapsuladas permaneciendo viables por hasta 10 años, de este modo, pueden continuar su ciclo de vida en períodos prolongados después de la infección si el hospedador paraténico es consumido por el huésped definitivo (Taira et al., 2011). Los trayectos de migración, así como las áreas de predilección dependen de la especie huésped, casi la mayoría de los órganos pueden ser afectados con varios grados de cargas larvarias.

En el hospedador paraténico, *T. canis* parece mostrar atracción hacia el SNC, en tanto que el cerebro y ojos se infectan por lo regular en un punto posterior a la infección (Hurtado et al., 2000) Se ha sugerido que el grado de suministro de sangre de los diferentes órganos juega un papel en la ruta de larvas, ya que las larvas están ingresando al sistema circulatorio y se distribuyen en el hígado de esa manera. La mayoría de las larvas permanecen allí, pero algunas abandonan el hígado activamente. Se han intentado explicar la mayor neuro afinidad de *T. canis*, en oposición a las larvas de *T. cati* por su diferencia de tamaño.

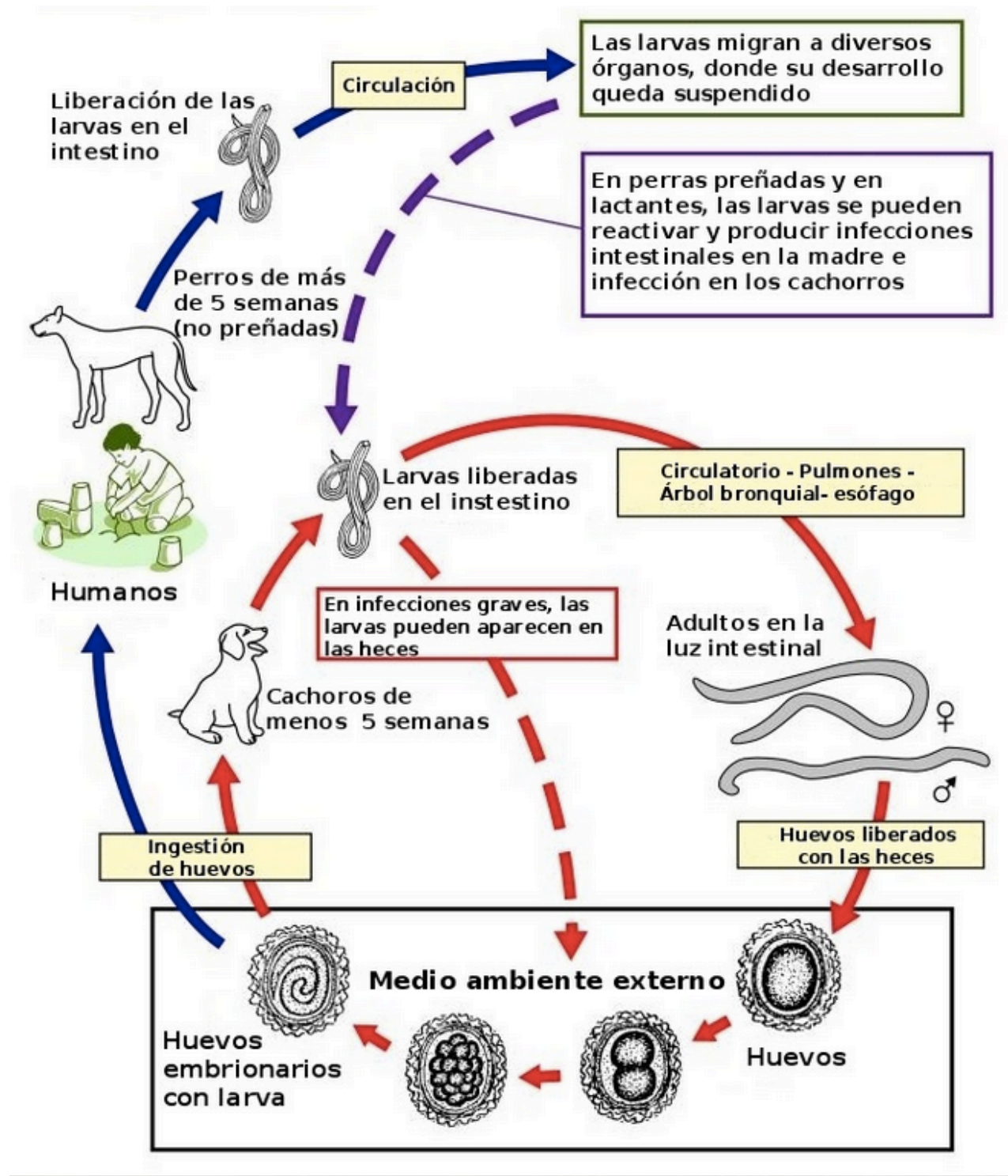


Fig 03. Ciclo de vida de *Toxocara canis* (CDC, 2014)

2. 1. 6 Huevos de *Toxocara canis*

Las hembras de *T. canis* pueden ovopositar miles de huevos por día, produciendo una fuerte contaminación del medio ambiente. Estos huevos son robustos y altamente resistentes a las duras condiciones climáticas ambientales y a los desinfectantes químicos. Los HTC pueden sobrevivir durante años en un ambiente favorable, sirviendo como fuente de infección para huéspedes adecuados, incluyendo humanos. Bajo condiciones óptimas, los huevos de *T. canis* resistentes al medio ambiente experimentan embriogénesis en 2-3 semanas para convertirse en infecciosos.

La desinfección de las superficies contaminadas con HTC es importante debido a la amenaza de salud pública para los seres humanos y las mascotas. (Agencia de Salud Pública de Canadá., 2016). Una comprensión mejorada de la susceptibilidad a los desinfectantes es esencial con el fin de hacer recomendaciones para el manejo y la eliminación de los huevos de HTC de las superficies contaminadas. El hipoclorito de sodio se sugiere habitualmente como desinfectante (Aycicek et al., 2001, Agencia de Salud Pública de Canadá., 2016). Sin embargo, informes anteriores indican que la efectividad de los desinfectantes utilizados rutinariamente para eliminar e inactivar los HTC, son ineficientes y poco claros (Morrondo et al., 2006; Verocai et al., 2010). De la misma manera Rosypal y colaboradores (2017) investigó los efectos del blanqueador comercial determinando que estos no inactivan a los HTC.

Los huevos de *Toxocara canis* (HTC) miden alrededor de 85 μm , tienen una forma subglobosa con una envoltura irregular, y el protoplasma tiene un aspecto granular, (Rodriguez et al. 2006) se encuentran constituidos por cinco capas, las cuales se le atribuyen su capacidad de subsistencia en el ambiente, la estructura y función de la cáscara han sido considerados como adaptaciones que aumentan la supervivencia de la larva) (Wharton 1980; Morrondo et al., 2006; Magaña et al., 2016).

La disposición de cinco capas es la siguiente, desde la capa más externa hasta la más interna: una membrana uterina delgada con pequeñas protuberancias; una capa vitelina representada por una delgada membrana que sigue el contorno de las crestas y de una capa subyacente; una gruesa capa quitina homogénea (hasta 6,3 μm); una capa granular denso de electrones con un grosor medio de 0,35 μm ; y una zona laminar formada por la superposición de cuatro o cinco capas fibrosas con un espesor medio de 0,6 μm (Ayc ıc ek *et al.*,1 2001). Debido a esta conformación se le atribuye una resistencia estructural a condiciones ambientales y químicas desfavorables fig. 04.

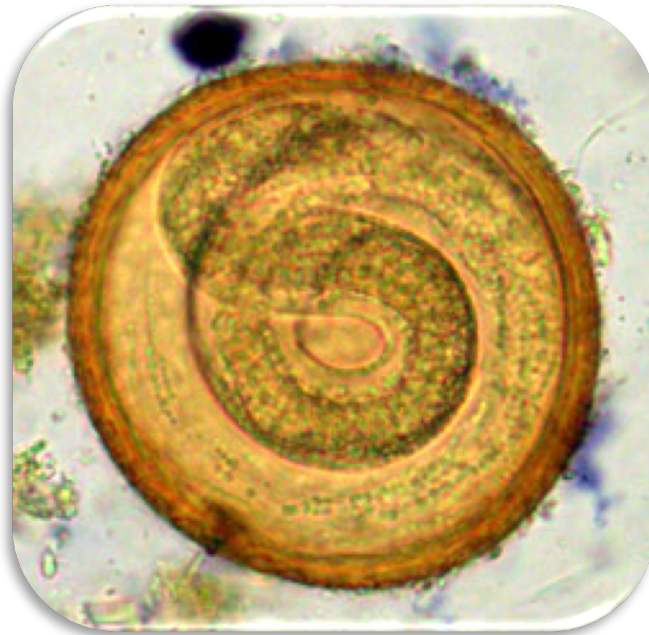


Fig 04. Huevo larvado de *T. canis* (Departamento de parasitología, UNAM ,2016)

2. 1. 7 Epidemiología de *T. canis*

Toxocara canis tiene una distribución mundial. La prevalencia se ha reportado como 1,2% y 3,2% en Australia, 77 4,4% y 4,6% en los Países Bajos, 28 y 6,1. En algunas encuestas en países como Nigeria, Portugal, India y China, la prevalencia es de 51-100% en cachorros, 1- 45% en perros adultos y en EE. UU., Algunos de los más de 77 millones de perros y 93 millones de gatos propagan *toxocariosis* excretando heces que contienen huevos en jardines, parques, patios de recreo y pozos de arena; una vez que los huevos se convierten en infecciosos, estos espacios suponen un peligro significativo hacia la salud pública (Guangxu et al., 2017). La mayor prevalencia se localiza en países tropicales y subtropicales (Kuenzlia et al., 2016) El síndrome de LMV en humanos es investigado en heterogéneas naciones como Estados Unidos de América, Australia, Sudáfrica, México, Argentina, distintas partes de Europa, Brasil, Colombia y Venezuela, (Delgado O & Rodríguez M., 2009).

En la región del sureste del estado de México, se realizaron investigaciones en donde se encontró prevalencia de este parásito, siendo 41,7% fueron positivos para la presencia de óvulos de parásito, también se encontraron huevos de *Toxocara* en el pelaje de la cabeza (14,5%), cola (20,8%) y extremidades (10,4%) siendo los cachorros, menores de 12 meses, los que mostraron valores más altos (4,7%) de presencia de huevos en el área perianal (Rojas et al., 2017).

Hasta el momento no se han realizado estudios en áreas rurales de México, donde se esperan mayores tasas de infección, además no se ha determinado la prevalencia del síndrome de larva migratoria ocular asociado a *Toxocara canis*, por lo que se deben realizar más estudios para determinar con mejor precisión la carga de esta enfermedad entre la población mexicana (Bolivar et al., 2014)

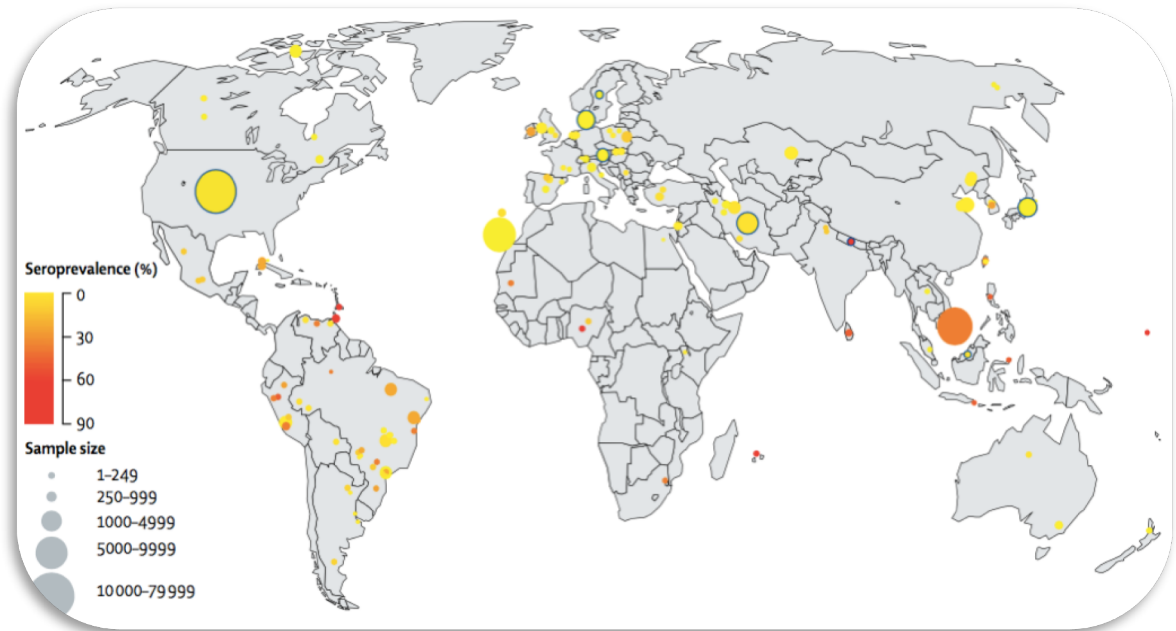


Fig 05. Prevalencias y los rangos de tamaño de muestra (número de individuos examinados), cada punto amarillo con un halo azul representa una encuesta nacional definida (Guangxu et al., 2017)

2. 1. 7 Tratamientos convencionales

Los dos principales obstáculos para el éxito del tratamiento de la toxocariosis en seres humanos son: el requisito de que los fármacos lleguen a las larvas a través de una serie de tejidos; y la dificultad en la verificación de la eficacia de los fármacos en los pacientes. El tratamiento con antihelmínticos se recomienda para la toxocariosis aguda, en particular para evitar que las larvas de *T. canis* lleguen al cerebro y los ojos.

El Albendazol (ABZ) y el Mebendazol se usan comúnmente para tratar larvas migratorias viscerales, sin embargo ambos fármacos poseen limitantes, por ejemplo el ABZ presenta limitada eficacia contra las larvas en tejidos; es preferible porque se distribuye ampliamente a través de los tejidos cuando es metabolizada, mientras que el mebendazol no se absorbe fuera del tracto gastrointestinal (Pawlowski., 2001)

A pesar de ser serológicamente negativos, algunos niños con toxocariosis pueden presentar síntomas, como dolores de cabeza, que persisten incluso después de tres rondas de tratamiento con ABZ o mebendazol. Se recomienda el albendazol por 10 y 15 mg / kg / día durante cuatro semanas o incluso hasta ocho semanas. A pesar de que el albendazol es un antihelmíntico seguro y bien conocido, sigue siendo necesario un control exhaustivo de los efectos secundarios (Hombu et al., 2017)

Esta cuestión es considerable para la salud humana debido a los tiempos de supervivencia de los HTC, que resaltan en gran medida entre los períodos de tiempo reportados para otros parásitos, otros fármacos antihelmínticos más utilizados para el tratamiento de la toxocariosis humana pertenecen al grupo de los carbamatos de benzimidazol. Sin embargo, estos fármacos presentan una insuficiente biodisponibilidad en los tejidos, debido a su baja solubilidad, requiriendo altas dosis durante largos períodos (Hrckova et al., 2001; Jean et al., 2001; Pawlowski., 2001; Woodhall et al., 2014)

2. 2 Los Metales en la Farmacología

Los avances en el diseño racional de terapéutica a base de metal, han aumentado después del importante descubrimiento de cisplatino, una droga exitosa, contra el cáncer basada en el principal impulso para la expansión de los complejos metálicos en el cáncer y otras patologías. En otros estudios Magaña y colaboradores (2016) reportó que minerales como plata (Ag), cobre (Cu), zinc (Zn), titanio (Ti) y fierro (Fe) intervinieron en el desarrollo embrionario de HTC, atribuyéndose el daño estructural mediado por el esfuerzo mecánico producido por el contacto de la superficie de los minerales con los HTC, así como sinergia de la interacción al estrés químico entre la biomasa de los HTC y los agregados minerales. Los aspectos más relevantes observados en dicha investigación fue la presencia de rupturas, desgarros y severo adelgazamiento de las capas externas e internas, así como la fuga de material hialino y nuclear.

2. 2. 1 Complejos metálicos

El desarrollo de complejos de metales bioactivos que llevan donantes de nitrogénos y otros ligandos han sido reconocido como alternativa prometedora y atractiva en la búsqueda de fármacos metálicos antiparasitarios y antimicrobianos. Los complejos metálicos derivados de azol han demostrado mayores actividades antimicrobianas que los azoles libres, el aumento en las propiedades antimicrobianas de los compuestos fue asociado a un aumento en la lipofilia farmacológica (Gammal et al., 2015, Keshia et al., 2016).

Basándonos en el gran interés en el diseño de la sustancia anti-HTC y en algunos medicamentos disponibles para el tratamiento de Toxocariosis, centramos nuestra investigación en el uso de complejos de metal y derivados compuestos de azol. A nuestro entender, el uso de complejos derivados de los azoles para la morfología y la viabilidad de las HTC aún no se ha informado

3. JUSTIFICACIÓN

“Debido a que los métodos convencionales y farmacológicos para la inactivación de los huevos de *T. canis* han mostrado poca eficiencia, se optó por utilizar complejos metálicos como un método alternativo para solucionar esta problemática.”

4. HIPÓTESIS

“Es posible afectar la viabilidad de los huevos de *T.canis* mediante su exposición a complejos metálicos”

5. OBJETIVO DEL TRABAJO

“Evaluar la viabilidad de los huevos de *T. canis* luego de su exposición a los complejos metálicos”

5.1 Objetivos específicos

1. Establecer un protocolo de evaluación *in vitro* de los compuestos metálicos sobre los huevos de *T. canis*.
2. Evaluar la viabilidad y morfología de los huevos de *T. canis* expuestos a los compuestos metálicos.
3. Proponer un eventual mecanismo de acción.
4. Evaluar la citotoxicidad de los complejos metálicos en una línea celular.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Muestras biológicas

Los nemátodos fueron obtenidos de cachorros infectados de manera natural en centro de control canino de la ciudad de Guadalupe, Nuevo Leon, México. Para la obtención de los parásitos, fue administrado un desparasitante comercial (pyrantel pamoate, Pfizer) a diferentes cachorros encontrándose parásitos en 3 de 6 caninos. Los parásitos adultos fueron transportados dentro de un recipiente con tapa hermética con solución salina fisiológica (28 °c), los estudios se realizaron en el laboratorio de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Se seleccionaron los parásitos hembras y se procedió a la disección en la región distal del útero de la hembra adulta (Fig. 06 A), debido a que en esa zona se concentra la mayor cantidad de huevos fértiles necesarios para el experimento, posteriormente los huevos obtenidos fueron colocados en recipientes estériles y siendo lavados por centrifugación 3 veces con 5 ml de solución salina (Fig.06 B)



A



B

Fig 06. Obtención de hembras grávidas y recolección de huevos Fotografía B: Alejandra Flores (Departamento de Parasitología, FMVZ- UANL, 2016)

6. 2 Complejos metálicos

Los compuestos utilizados fueron sintetizados en el departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes (Colombia), benéficamente estas moléculas cumplen con la “Regla cinco de Lipinski”, que es una medida que permite evaluar cualitativamente cómo podría resultar un compuesto químico para cumplir alguna determinada función farmacológica o actividad biológica una vez que es ingerido como medicamento para consumo oral en seres humanos (Fischer & Ganellin, 2006).

Esta regla fue formulada por Christopher A. Lipinski en el año 1997, basado en la observación de que la mayoría de los compuestos químicos utilizados en medicamentos son moléculas relativamente pequeñas y lipofílicas

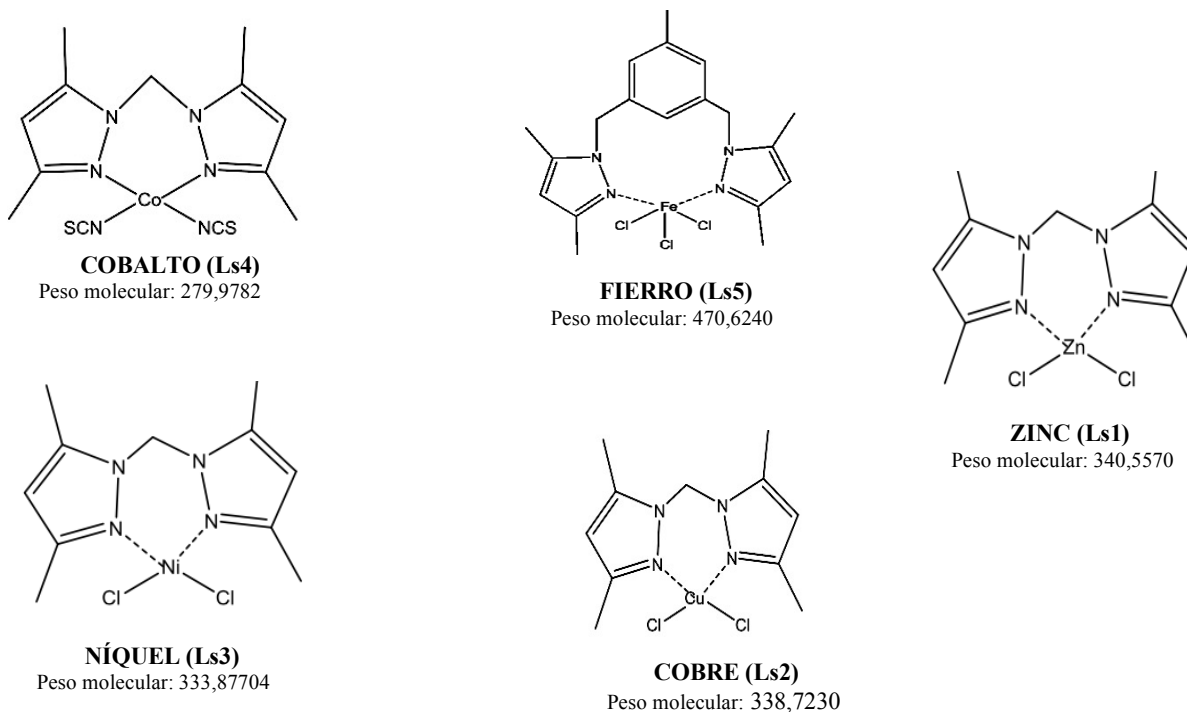


Fig 07. Complejos metálicos utilizados en la investigación

6. 3 Ensayo *In vitro*

La actividad nematocida se evaluó en términos de movilidad relativa (MR). Este método fue desarrollado originalmente por Kiuchi y colaboradores (1987). Sin embargo, debido a los diferentes tipos de movimientos observados durante los ensayos, tuvimos que adaptar este sistema, añadiendo más puntuaciones como se muestra en la Tabla 1. Después de 48 horas de exposición a las sustancias de ensayo, Examinado bajo un microscopio invertido.

Una vez que se encontró el 90% de huevos embrionados fueron sometidos al ensayo *in vitro*, que se realizó en microplacas de 24 pocillos (30 larvas / pocillo) con las sustancias de ensayo (Ls1, Ls2, Ls3, Ls4, Ls5), además se utilizó ABZ como fármaco de referencia. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y en tres concentraciones 5 μM , 10 μM y 15 μM . Se visualizaron en el microscopio invertido Stemi-200C cada tercer día para verificar el desarrollo embrionario y así poder anular una posible contaminación bacteriana y/o fúngica.

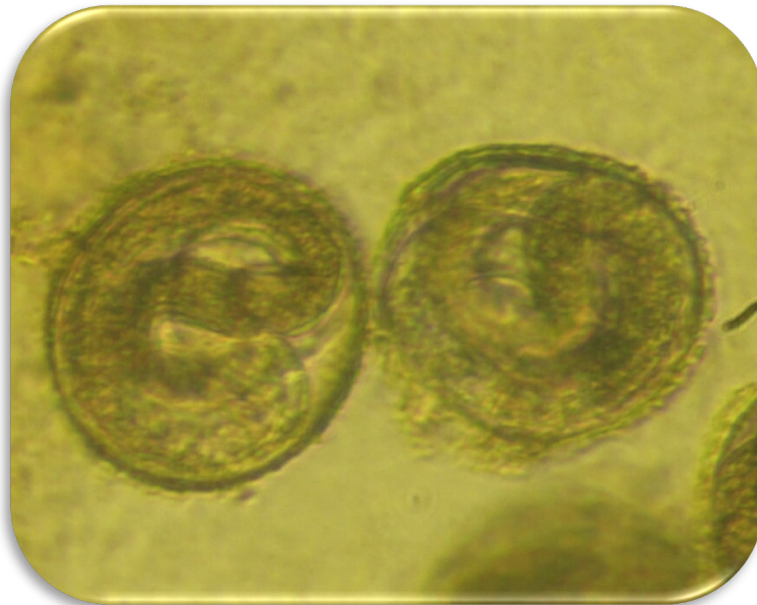


Fig 08. Huevos embrionados de *T.canis*. Fotografía: LHS.

6. 3. 1 Criterios de movilidad relativa (MR)

La puntuación correspondiente a un movimiento específico se atribuyó a cada larva como se muestra en la tabla 1. La mortalidad de las larvas se calculó como el número de larvas que recibieron la puntuación 0 dividida por el número total de larvas en cada pozo (Kiuchi et al.,1987; Reis et al., 2010)

Tab. 01 Criterios para evaluar el efecto de los compuestos sobre los huevos larvados de *Toxocara canis*.

Estadios de la larva	(n)
Movimiento rápido con todo el cuerpo	5
Movimiento intermedio con todo el cuerpo	4
Movimiento lento con todo el cuerpo	3
Movimiento con una sola parte del cuerpo	2
Inmóvil pero no muerto	1
Muerto	0

6. 4 Toxicidad de los complejos metálicos

Para establecer una medida de citotoxicidad de los compuestos, se preparan placas de cultivo celular de 96 pocillos con una línea celular murina de hepatocitos BpRc1 (ATCC® CRL-2217™).

6. 4. 2 Cultivo Celular

La línea celular utilizada se cultivó en condiciones óptimas de crecimiento, se conservaron a temperatura de 37 ° C, una humedad de ≈82%, una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ en una incubadora con atmósfera de CO₂ (Thermo Científico). Se usaron los medios de cultivo recomendados (GIBCO®) complementados con penicilina / estreptomicina (GIBCO®) y suero bovino fetal (SBF, GIBCO®). El sustento de la línea celular utilizada fue realizado de acuerdo con la información provista por la guía ATCC correspondiente.

6. 5 Evaluación de la citotoxicidad

La línea celular hepatocitos BpRc1 (ATCC® CRL-2217™) estuvo en contacto con los compuestos a la misma concentración utilizada en el ensayo in vitro. Las células se sembraron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos con 5x10⁴ células / pocillo y, *veinticuatro horas despues se agregaron los compuestos complejpos metalicos a la mismas concentraciones utilizadas en el ensayo in vitro* se complementaron por triplicado con cada compuesto. Todas las diluciones se prepararon con medios de cultivo frescos, y las placas se incubaron durante 24 horas adicionales. Las células en las placas se lavaron con PBS pH = 7,4 para eliminar las células muertas, y las células supervivientes se estimaron entonces como una medida del efecto citotóxico comparado con una preparación simulada. El método rojo neutro se utilizó para determinar la viabilidad celular (Repetto, 2008) las pruebas se corrieron por triplicado

7. RESULTADOS

7.1 Movilidad Relativa

Los complejos de azole metálico han mostrado actividad antimicrobiana y antiparasitaria (Gammal et al., 2015, Keshia et al., 2016, Hurtado et al., 2017). Sin embargo, no se ha estudiado la eficacia de estos compuestos frente a los parásitos. En este trabajo, evaluamos las actividades anti-HTCs de, complejos metálicos en diferentes concentraciones. Los resultados mostraron que la movilidad de los HTC fue baja cuando se expusieron a diferentes concentraciones de los compuestos Ls1, Ls2, Ls3, Ls4, Ls5 (Figura 2), con el complejo Ls2 se observó una menor movilidad a 15 μ M, incluso por debajo de la observada con el antihelmíntico estándar ABZ. En general, estos efectos anti-HTC son dependientes de la concentración (Fig. 09)

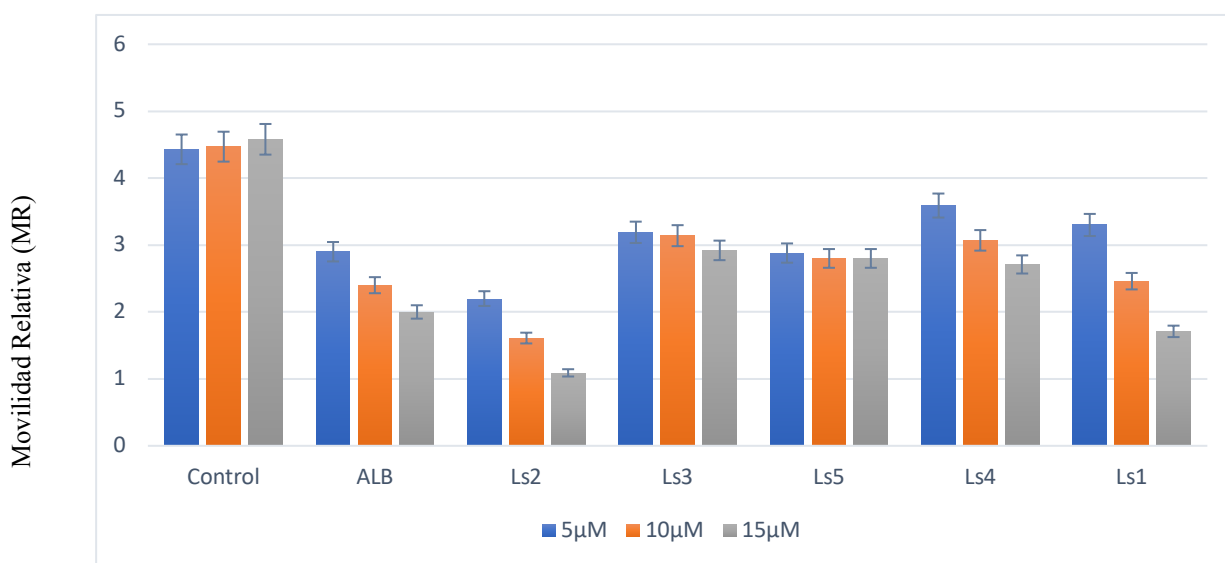
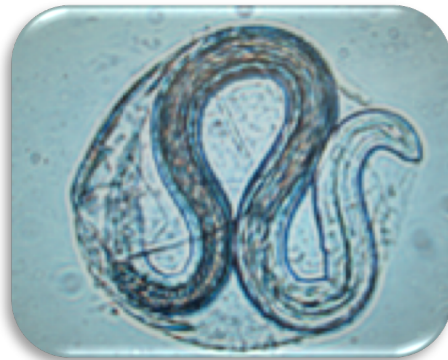


Fig 09. Movilidad Relativa (MR) de los huevos de *Toxocara canis* expuestos a las concentraciones y el antihelmíntico estándar Albendazol (ABZ).

7. 1. 2 Morfología larvaria

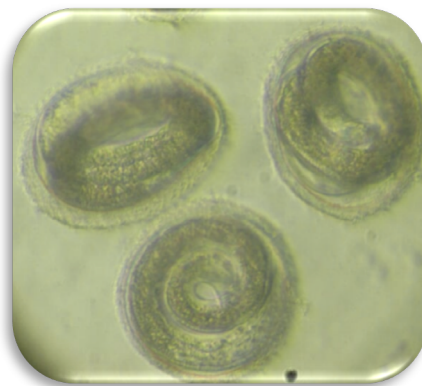
Se encontraron alteraciones estructurales al realizar la evaluación de la morfología posterior al bioensayo, los resultados más significativos fue con el complejo Ls2, las larvas mostraron degeneración de la cutícula, incluso más que el antihelmíntico Albendazol (Figura 10,b).



A) HTC Control



B) HTC Expuesto al compuesto Ls2 (15



C) HTC Expuesto ABZ (15 μM)

Fig 10. Morfología de los parásitos dentro del huevo A) sin exposición a los compuestos, B) exposición a Ls2 (15 μM) C) antihelmítico estándar ABZ .

7. 1. 3 Evaluación de la Toxicidad

Se realizó un estudio sobre la actividad citotóxica de las células de hepatocitos. En los estudios de citotoxicidad se observa que los compuestos en 24 h no presentaron citotoxicidad (Figura 11). La viabilidad de los hepatocitos siempre fue superior al 60% para todos los compuestos independientemente de la concentración. Porcentaje de viabilidad que es lo que estamos obteniendo, colocar en la metodología de rojo neutro

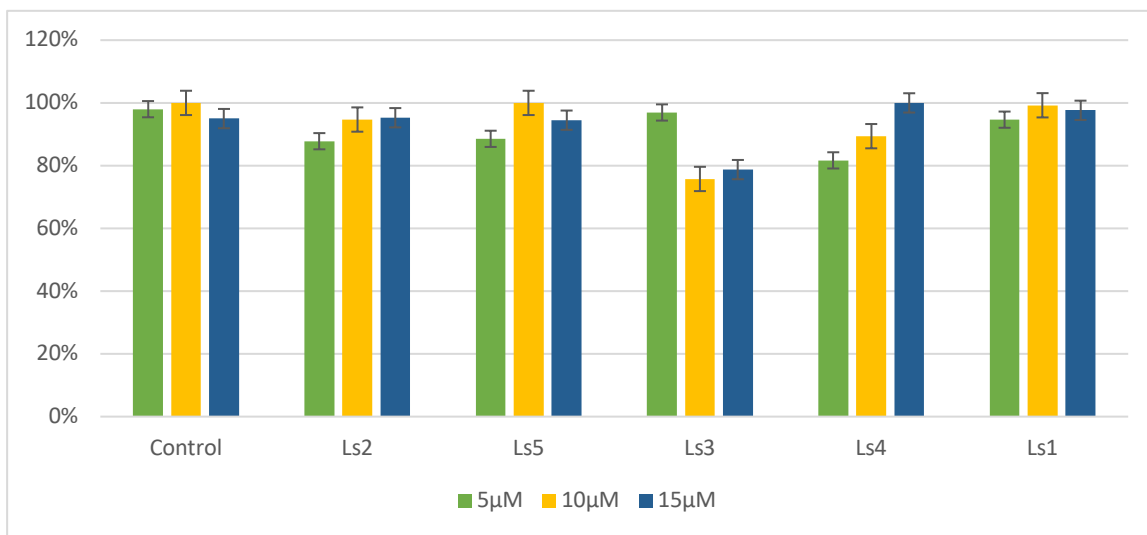


Fig 11. Citotoxicidad en hepatocitos de Ls1- Ls5, la figura muestra el porcentaje de viabilidad celular en diferentes concentraciones de los compuestos

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actualmente los parásitos zoonóticos se están reconociendo cada vez más como agentes patógenos importantes con impactos significativos en la economía mundial, el medio ambiente y la salud pública. Más de tres mil millones de personas en todo el mundo están infectadas con uno o más parásitos con morbilidad y mortalidad variables (OMS, 2005)

Los cambios climáticos y enfermedades transmitidas por vectores, la escalada del número de infecciones parasitarias emergentes o reemergentes, la velocidad alarmante a la que se desarrolló el tratamiento antiparasitario, y el costo elevado en el desarrollo de nuevos fármacos antiparasitarios; Son algunos de los desafíos que hacen que el futuro del tratamiento y el control de muchas enfermedades parasitarias sea incierto, por lo tanto surge la necesidad de la creación e innovación de nuevos fármacos (Mattie et al., 2008).

Una zoonosis parasitaria menospreciada, es causada por larvas de los nematodos del género *Toxocara*. Es una geohelmintiasis de animales de gran importancia en salud pública. Se considera que la principal especie patógena es: *Toxocara canis*, parásito de cánidos, entre ellos perros, zorros, lobos, coyotes (Endo et al., 2012).

Los HTC son altamente resistentes a condiciones ambientales adversas y desinfectantes químicos de uso rutinario (Aycık et al., 2001; Rosypal., 2017). Entre las posibilidades de ayudar en este ámbito se han hecho investigaciones de nuevos fármacos (Schwab et al., 2005). Por lo tanto, se requieren mejoras en ABZ para desarrollar nuevas formulaciones de fármacos para aumentar su eficacia terapéutica.

Actualmente se han desarrollado nuevos fármacos, Zafir y colaboradores (2016) adoptó una estrategia alternativa para aumentar la eficacia antifilarial de ABL utilizando CuO como adyuvante mediante la formación de nanocompuesto ABZ-CuO, demostrando que su uso contra la larva de *Haemonchus contortus* inducía su muerte asociado al incremento de especies reactivas que este le ocasiona.

En otros estudios Magaña y colaboradores (2016) reportó que minerales como plata (Ag), cobre (Cu), zinc (Zn), titanio (Ti) y fierro (Fe) intervinieron en el desarrollo embrionario de HTC, atribuyéndose el daño estructural mediado por el esfuerzo mecánico producido por el contacto de la superficie de los minerales con los HTC, así como sinergia de la interacción al estrés químico entre la biomasa de los HTC y los agregados minerales.

En nuestros resultados la prueba de control mostró un HTC con estructuras intactas, observando una clara delimitación, homogeneidad y diferenciación en cada una. Mientras que la exposición a los HTC a los compuestos Ls1 a Ls5 se caracterizó por diferencias en la geometría ovoide inicial, heterogeneidad estructural y variación de componente de constituyentes externos, este hallazgo está probablemente relacionado con la mejor solubilidad, biodisponibilidad y la interacción con el ADN a través de asociaciones intermoleculares (Hurtado., et al 2017). Además, es posible que un aumento en la lipofilidad de los compuestos reduzca la barrera de permeabilidad de los HTC, retrasando los procesos celulares normales de los microorganismos, dando como resultado una actividad antiparasitaria (Keshia., et al 2016).

La morfología de los HTC fue otra de las características que se tuvieron en cuenta para esta investigación encontrándose alteraciones estructurales, estas pueden deberse a la presencia de los complejos de azol, ya que podrían estar inhibiendo algunas de las muchas etapas que conducen a la síntesis de tubulina en las paredes celulares de los parásitos (Kappagoda., et al 2011).

Cabe destacar que es la primera vez que se utilizan complejos metálicos derivados de azol contra los HTC, sin embargo, estos productos necesitan someterse a una rigurosa evaluación in vivo para asegurar su eficacia y seguridad y, si es posible, establecer su farmacodinamia. Curiosamente, los compuestos no evidenciaron signos de efectos citotóxicos en la línea celular murina, podría ser un tratamiento potencial anti-HTCs.

9. CONCLUSIONES

En la actual tesis se evaluaron cinco diferentes moléculas siendo complejos metálicos derivados de azol contra huevos de *Toxocora canis*. Los ensayos *in vitro* demostraron que los compuestos en general tienen actividad anti-HTCs moderada. La baja motilidad de las larvas y el daño morfológico indicaron que el compuesto Ls2 tenía mayor actividad anti-HTC.

- ✓ En la presente investigación se logró establecer el protocolo de evaluación *in vitro* de los HTC de los complejos metálicos sobre los huevos de *T. canis*, realizándose en concentraciones bajas de 10, 15 y 20 μM , por tiempos definidos de 48 h.
- ✓ Se evaluó la viabilidad y morfología de los huevos de *T. canis* expuestos a los compuestos metálicos, en donde se terminó que el complejo Ls2 presentaba mayor actividad biológica tanto en movilidad como en morfología ante los HTC al utilizarse en concentración de 15 μM en 48 H.
- ✓ Actualmente se desconoce el mecanismo de acción por el cual pudiera estar ejerciendo el efecto farmacológico el complejo metálico, sin embargo otras investigaciones como las de Zafir y colaboradores (2016) demostraron que el uso de nanopartículas de óxido de cobre incrementaban los radicales de oxígeno e inducían apoptosis.
- ✓ Además, los compuestos mostraron poco efecto sobre los hepatocitos indicando que no son citotóxicos. Los derivados de los complejos metálicos del azol son moléculas prometedoras para desarrollar fármacos contra Toxocariasis. Se deben realizar nuevos estudios modificando sus estructuras y probándolas con otras etapas de parásitos para definir el papel exacto de estos compuestos contra diversos parásitos.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICA

Anirt N, Benmary O, María M, Olivar C et al. 2012. Standardization of ELISA technique for the immunological diagnosis of human toxocariasis. Bol. Mal. Salud Amb 52: 21-32

Archelli S & Kozubsky L 2008. *Toxocara* y Toxocariosis* *Toxocara and toxocariosis*. Acta Bioquím Clín Latinoam 3: 379-84.

Aycıçek H, Yarsan ES, Tanyüksel M, Girginkardes et al. 2001. Efficacy of some disinfectants on embryonated eggs of *Toxocara canis*. Turk. J. Med. Sci 31: 35–39.

Bolivar A, Alarcón C, Calvo L, Paniz A et al. 2014. Toxocariasis in the Americas: Burden and Disease Control. Curr Trop Med Rep 1: 62–68

Biot C, Castro W, Cyrille Y, Navarro M. 2012. The therapeutic potential of metal-based antimalarial agents: implications for the mechanism of action. The Royal Society of Chemistry 41: 6335–6349.

Chomel B. Wildlife Zoonoses. 2007. Emerging Infectious Diseases. [Online] Disponible en: <http://www.cdc.gov/EID/13/1/06-0480.htm>.

Camilo RÑ, Selene YA, Germán DM, Lilia PB, et al. 2013. Contamination and viability of eggs of *Toxocara spp.* in soil and feces collected from public parks, streets and dogs in Toluca, México. Revista Científica, FCV-LUZ 13: 475-479.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2016. Animals (Zoonotic). [Online] Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/animals.html>

Divyamol T, Jeyathilakan N, Abdul B, Senthilkumar. 2014. *In vitro* production of *Toxocara canis* excretory-secretory (TES) antigen. J Parasit Dis 40:1038-1043.

Delgado O & Rodríguez M .2009. Aspectos clínico - epidemiológicos de la toxocariasis: una enfermedad desatendida en Venezuela y América Latina. Boletín de Malariología y Salud Ambiental 49:1-20.

De Sousa P, Raquel D, Luciana F, Paula L, et al. 2015. Transmammary infection in BALB/c mice with chronic toxocariasis. Parasitology International 64: 64-65.

De la Fé Rodríguez, D., Duménigo Ripoll, B., Brito Alberto, E, Aguiar Sotelo, J. 2006. *Toxocara canis* y Síndrome Larva Migrans Visceralis (*Toxocara canis* and Syndrome Larva Migrans Visceralis). Revista Electrónica de Veterinaria 4:1-42.

Elsheikha H M, 2014. The future of parasitology: challenges and opportunities. Frontiers in Veterinary Science 1: 1-2.

Fischer & Ganellin 2006, “Analogue-based Drug Discovery”
J. R. Proudfoot pag 25-29

Gustavo Marcal, Schmidt Garcia Moreira, Paula de Lima Telmo, et al, 2014. Human toxocariasis: current advances in diagnostics, treatment, and interventions. Cell Press 30 : 456- 464

Guangxu M, Celia V, Tao W et al. 2017. Human toxocariasis. The Lancet Infectious Diseases 17: 1-11.

Garza JR. 2010. La situación actual de las zoonosis más frecuentes en México. Gaceta Médica de México 6:146-430.

Gammal E, Bekheit MM, Tahoon M. 2015. Synthesis, Characterization and Biological Activity of 2-Acetylpyridine- α -Naphthoxyacetylhydrazone Its Metal Complexes. Spectrochimica. Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 135: 597–607.

Hrckova G, Velebny S. 2001. Treatment of *Toxocara canis* infections in mice with liposome-incorporated benzimidazole carbamates and immunomodulator glucan. Journal of Helminthology 75: 141–146.

Hurtado J, Portaluppi M, Quijada R, Rojas R et al. 2009. Synthesis, characterization, and reactivity studies in ethylene polymerization of cyclometalated palladium(II) complexes containing terdentate ligands with N,C,N-donors. *Journal of Coordination Chemistry* 62: 2772-2781.

Hurtado A, Tortora F, Tsutsumi P, Pierres O et al, 2000. Histopathological investigation of experimental ocular toxocariasis in gerbils. *Int. J. Parasitol* 30: 143–147.

Hombu A, Yoshida A, Kikuchi T, Nagayasu E, et al. 2017. Treatment of larva migrans syndrome with long-term administration of albendazole. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 10:1-6.

Hurtado J, Ibarra L, Yepes D, García H et al. 2017. Synthesis, crystal structure, catalytic and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of a new chromium(III) complex containing bis(3,5-dimethylpyrazol-1-yl)methane. *Journal of Molecular Structure* 1146: 365-372.

Judith P, Roger H, Arturo H, Rolando C, et al 2011. Toxocariosis humana en el Perú: aspectos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio humano. *Acta Med Per* 28: 228-236.

Jean FM, Lawrence TG, Philippe D, Bruno M. 2001. Highlights of human toxocariasis *The Korean Journal of Parasitology* 39: 1-11.

Kiuchi F, Miyashita N, Tsuda Y et al 1987. Studies on crude drugs effective on Visceral Larva Migrans. I. Identification of larvicidal principles in betel nuts. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 35: 2880-2886

Keshia FC, Nestor JB, Nelson GÑ, Homero FP. 2016. Metal complex derivatives of Azole: a study on their synthesis, characterization, and antibacterial and antifungal activities. *J Braz Chem Soc* 00: 1-14.

Magaña R, Luna V, Barrera J, Orta M, et al 2016. Effect of mineral aggregates on the morphology and viability of *Toxocara canis* eggs. *Ecological Engineering* 90: 125–134.

Morrondo P, Morrondo CD, Pedreira J, Díez NB, et al. 2006. *Toxocara canis* larvae viability after disinfectant exposition. *Parasitol Res* 99: 558–561.

Mariana R, Alcione T, Maria JU, Ana MP, et al. 2010. *Toxocara canis*: Potential activity of natural products against second-stage larvae *in vitro* and *in vivo*. *Experimental Parasitology* 126: 191–197.

Machura B, Palion J, Penkala T, Groń, H et al. 2013. Thiocyanate manganese(II) and cobalt(II) complexes of bis(pyrazol-1-yl)methane and bis(3,5-dimethylpyrazol-1-yl)methane – Syntheses, spectroscopic characterization, X-ray structure and magnetic .*Polyhedron* 56; 189-199.

Maizels RM, Tetteh, KK, Loukas A. 2000. *Toxocara canis*: genes expressed by the arrested infective larval stage of a parasitic nematode. *International Journal for Parasitology* 30: 495–508.

Mun S, Cho SH, Kim TS, Oh B.T, et al. 2009. Inactivation of *Ascaris* eggs in soil by microwave treatment compared to UV and ozone treatment. *Chemosphere* 77: 285–290.

Marcial G, Schmidt G M, Paula LT et al 2014. Human toxocariasis: current advances in diagnostics, treatment, and interventions. *Trends in Parasitology Cell Press* 30: 456 - 464

Mattos GT, Costa DS, Lima TP, Aires BM et al .2016. Human Toxocariasis: prevalence and factors associated with biosafety in research laboratories *American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 95: 1428 – 1431.

Mohamed ME, Samy IE, Ahmad AO et al. 2015. Immunopathological Changes in the Brain of Immunosuppressed Mice Experimentally Infected with *Toxocara canis*. *Korean J Parasitol* 53: 51-58.

Morrondo P, Morrondo CD, Pedreira J, Díez NB, et al. 2006. *Toxocara canis* larvae viability after disinfectant - exposition. *Parasitol Res* 99: 558–561.

Mariana R, Alcione T, Maria JU, Ana MP et al. 2010. *Toxocara canis*: Potential activity of natural products against second-stage larvae *in vitro* and *in vivo*. *Experimental Parasitology* 126: 191–197.

Magnaival J, Glickman L, Dorchies P, et al. 2001. Highlights of human toxocariasis. *The Korean Journal of Parasitology* 39: 1-11.

Nicolletti A. 2013. *Handbook of Clinical Neurology, Neuroparasitology and Tropical Neurology* H.H. Garcia, H.B. Tanowitz, and O.H. Del Brutto, Editors, pp. 217-228

Pawlowski Z. 2001. Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. *Journal of Helminthology* 75: 299–305.

Patricia SA, Raquel DF, Luciana FC, Paula LT, et al. 2015. Transmammary infection in BALB/cmice with chronic toxocariasis. *Parasitology International* 64: 145- 147

Potapov A, Khlebnikov A. 2006. Synthesis of mixed-ligand copper(II) complexes containing bis(pyrazol-1-yl)methane ligands. *Polyhedron* 25: 2683–2690.

Rodríguez MD, Duménigo BE, Brito E, Aguilar SJ. 2006. *Toxocara canis* y Síndrome Larva Migrans Visceralis (*Toxocara canis* and syndrome larva Migrans Visceralis). *Rev. Electrón. Vet. REDVET* 7: 1–42.

OMS (2005). 14.a Reunión Interamericana a Nivel Ministerial en Salud y Agricultura. Organización Mundial de la Salud [Documento]. México.

Rojas T, Romero C, Heredia R, Bautista LG et al. 2017. Identification of *Toxocara* spp. eggs in dog hair and associated risk factors. *Veterinary World*, 10: 798-802.

Rosypal A, Houk A, Zajac A, Lindsay D. 2017. Flotation of *Toxocara canis* eggs in commercial bleach and effects of bleach treatment times on larval development in these eggs. *Journal Parasitol* 103: 183–186

Reis MA, Alcione T, Maria JF et al. 2010. *Toxocara canis*: Potential activity of natural products against second-stage larvae in vitro and in vivo. *Experimental Parasitology* 126 : 191–197

Kuenzlia E, Neumayra A, Chaneya M, Bluma J. 2016. Toxocariasis-associated cardiac diseases-A systematic review of the literature. *Acta Tropica* 154: 107–120.

Spren J, 1958. Observations on the development of *Toxocara canis* (Werner, 1782) in the dog. *Parasitology* 48:184 - 209.

Kappagoda S, Upinder S, DabBrian G. 2011. Antiparasitic Therapy. *Mayo Clinic Proceedings* 86: 561-583.

Taira K, Saitoh Y, Kapel C. 2011. *Toxocara cati* larvae persist and retain high infectivity in muscles of experimentally infected chickens. *Vet. Parasitol.* 180: 287–291.

Strube C, Heuer L, Janecek E. 2013. *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. *Veterinary Parasitology* 193: 375–389.

Wharton D. 1980. Nematode egg-shells. *Parasitology* 81: 447-63.

Woodhall D, Eberhard M, Parise M. 2014. Neglected Parasitic Infections in the United States: Toxocariasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 5: 810- 813.