



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE IVERMECTINA EN EMULGEL, MEDIANTE APLICACIÓN TÓPICA CONTRA LARVAS DE *Ancylostoma caninum* EN RATONES MACHOS CD1 CON INFECCIÓN INDUCIDA”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A :

PERLA BELÉM MENDOZA ROMERO

ASESOR:

M EN C. JUAN PABLO MARTÍNEZ LABAT

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO **APROBATORIO**

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis.

Actividad antiparasitaria de ivermectina en emulgel, mediante aplicación tópica contra larvas de *Ancylostoma caninum* en ratones machos CD1 con infección inducida.

Que presenta la pasante: Perla Belém Mendoza Romero
Con número de cuenta: 309083915 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

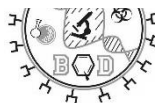
Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de Octubre de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Juan Pablo Martínez Labat	
VOCAL	M.V.Z. Gabriela Fuentes Cervantes	
SECRETARIO	Dra. Carolina Moreno Ramos	
1er. SUPLENTE	M. en C. Raquel María del Refugio Tapia Romero	
2do. SUPLENTE	Dr. Jorge Luis de la Rosa Arana	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).



Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme el orgullo de pertenecer a su comunidad universitaria, a la cual le debo la oportunidad de crecer profesional y personalmente dentro de sus instalaciones a lo largo de mi formación académica.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPIRITU”

A mi querida Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y a sus excelentes profesores de los cuales me siento muy honrada, a la Unidad de Administración Escolar y al Departamento de Exámenes Profesionales en especial a la I.A. Laura Cortazar por las facilidades y el apoyo invaluable para lograr esta meta.

A los miembros de mi jurado, M.V.Z. Gabriela Fuentes, Dra. Carolina Moreno, Dr. Jorge Luis de la Rosa por el apoyo y apertura, igualmente M. en C. Raquel Tapia por el respaldo y cercanía desde el aula, servicio social hasta la titulación.

Así mismo expresar mi gratitud y admiración a M. en C. Juan Pablo Martínez Labat, por la pasión con la que nos comparte y enamora de la Parasitología, así como el apoyo, paciencia e impulso en lo académico y lo profesional.

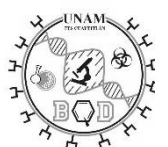
A mis amigos Brenda, Cynthia, Edgar y Luz por motivarme día a día académica y emocionalmente a lo largo de la carrera, pero sobre todo gracias por su amistad que llegó más allá de la universidad.

A mi familia por todo el amor y lo que me han enseñado para llegar hasta donde estoy el día de hoy. A mis hermanas por ser parte importante de mi existencia y alegrarme la vida día con día.

A mi papá, gracias por estar, por impulsarme e inspirarme, pero sobre todo por apoyarme en mis sueños que poco a poco vamos logrando.

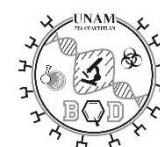
A mi mamá, por ser el pilar, mi fortaleza y mi ejemplo para ser una gran mujer.

“Celebra tus victorias porque nadie entiende realmente lo que te costó alcanzarlas”.

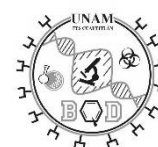


Índice General

Índice general.....	3
Índice de imágenes.....	5
Índice de gráficas.....	6
1. Resumen.....	7
2. Introducción.....	8
2.1. Generalidades.....	8
2.2. Epidemiología.....	8
2.3. Morfología.....	10
2.4. Ciclo Biológico.....	12
2.5. Patogenia.....	14
2.6. Larva Migrans Cutánea.....	17
2.7. Tratamiento.....	18
3. Objetivos.....	21
3.1. General.....	21
3.2. Particular.....	21
4. Hipótesis.....	21
5. Materiales y Metodología de la investigación.....	22
5.1. Material y equipo de laboratorio.....	22
5.2. Reactivos y Soluciones.....	22
5.3. Material Biológico.....	23
5.4. Obtención de larvas infectantes de <i>Ancylostoma caninum</i>	23
5.5. Inoculación.....	24
5.6. Formación de lotes de ratones de experimentación.....	24

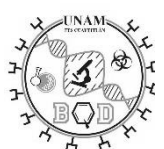


5.7. Sacrificio humanitario de ratones.....	24
5.8. Búsqueda de larvas de <i>Ancylostoma caninum</i>	25
5.9. Disposición de Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos.....	25
6. Antiparasitario.....	25
7. Resultados.....	28
8. Discusión.....	42
9. Conclusiones.....	51
10. Bibliografía.....	52



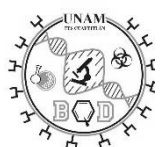
Índice de imágenes

Imagen 1. Distribución global de las helmintiasis transmitidas por el suelo en 2010.....	10
Imagen 2. Cápsula bucal de <i>Ancylostoma caninum</i> . 1550X.....	11
Imagen 3. Esquema de las fases adultas de <i>Ancylostoma caninum</i>	11
Imagen 4. Ciclo Biológico de <i>Ancylostoma caninum</i>	13
Imagen 5. Formación de poros en eritrocitos caninos inducidos por hemolisinas de <i>Ancylostoma caninum</i>	15
Imagen 6. Lesión asociada a Larva Migrans Cutánea en pie	18
Imagen 7. Mecanismo de acción de las avermectinas en la sinapsis del nemátodo	19
Imagen 8. Emulgel de ivermectina al 0.008%.....	26
Imagen 9. Fotografía de Larva 3 de <i>Ancylostoma caninum</i> recuperada en Lote 1.....	29
Imagen 10. Fotografía de Larva 3 de <i>Ancylostoma caninum</i> recuperada en Lote 3	30
Imagen 11. Fotografía de Larva 3 de <i>Ancylostoma caninum</i> recuperada en Lote 4.....	31
Imagen 12. Fotografía de Larva 3 de <i>Ancylostoma caninum</i> recuperada en Lote 5.....	32
Imagen 13. Fotografía de Larva 3 de <i>Ancylostoma caninum</i> recuperada en Lote 6.....	33
Imagen 14. Fotografía de pulmón de ratón de Lote 1.....	40



Índice de gráficas

Gráfica 1. Porcentaje de reducción de larvas y eficiencia del fármaco.....	37
Gráfica 2. Tendencia de migración por los diferentes órganos de los ratones infectados con <i>Ancylostoma caninum</i>	41

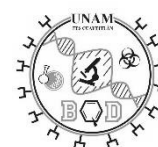


1. Resumen

En este trabajo se evaluó la actividad antiparasitaria de una nueva formulación de ivermectina en emulgel contra larvas enquistadas de *Ancylostoma caninum* en ratones con infección inducida, con la finalidad de identificar nuevas opciones de tratamiento en el perro y posiblemente el humano.

Se formaron 7 Lotes de 10 ratones machos cepa CD1 con infección inducida usando 500 larvas 3 de *Ancylostoma caninum* administradas vía oral. El Lote 1 y Lote 2 correspondieron al Control inoculado no tratado y Control no inoculado y no tratado, respectivamente. El Lote 3 (inoculado) inició tratamiento con emulgel de ivermectina al 0.008% (correspondiente a una dosis de 200µg/kg), el día posterior a la inoculación para evaluar si el fármaco inhibía la migración del parásito en el cuerpo de los animales. Los lotes 4 a 7 fueron sometidos a tratamiento 30 días posteriores a la inoculación. El tratamiento fue aplicado en la zona dorsal del cuerpo de cada ratón en la dosis ya descrita. Transcurridos 30 días posteriores a la inoculación se sacrificó al Lote 1, 2 y 3; la aplicación del tratamiento ocurrió en 4 sesiones cada 30 días, es decir, el Lote 4 recibió un tratamiento y fue sacrificado a los 30 días, el Lote 5 recibió dos tratamientos y fue sacrificado a los 60 días, el Lote 6 recibió tres tratamientos y fue sacrificado a los 90 días y finalmente el Lote 7 recibió 4 tratamientos y fue sacrificado a los 120 días. De cada uno de los animales se extrajo el bazo, cerebro, corazón, hígado, músculo esquelético, pulmón y riñón y se sometieron a digestión artificial del tejido para lograr la liberación de las larvas y cuantificarlas al microscopio. A partir de los datos obtenidos se realizó el análisis estadístico mediante análisis de varianza (ANOVA) y Tukey para determinar diferencia significativa entre los resultados, igualmente se aplicó la prueba de Wescot para obtener el porcentaje de eficacia del emulgel.

Dentro de los órganos con mayor presencia de larvas se encontraron el músculo esquelético, cerebro y corazón. La eficacia del fármaco resultó en la inhibición de la migración al aplicar el producto al día siguiente de la inoculación en 96.3%, una eficacia de 92.6% en la primera y segunda aplicación, mientras que en la tercera de 96.2% alcanzando el 100% con 4 aplicaciones del emulgel. Comprobando así su efectividad como antiparasitario en el modelo experimental en ratones macho CD1 con infección inducida.



2. Introducción

2.1. Generalidades

La ancilostomiasis es una parasitosis frecuente en caninos domésticos y salvajes, el agente etiológico es el nemátodo *Ancylostoma caninum*, que se localiza en el intestino delgado, es hematófago⁹ y uno de los parásitos más ampliamente distribuidos en el mundo causando infecciones graves que generan anemia grave, eventualmente mortal y deterioro físico³.

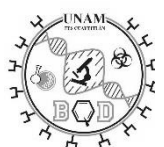
Existen otros géneros y especies emparentados con *Ancylostoma caninum* como *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Ancylostoma braziliense*, *Ancylostoma ceylanicum* y *Ancylostoma tubaeforme* que afectan a otras especies⁴.

Pertenecen al grupo de los llamados geohelminths, parásitos que destacan por su alta prevalencia y amplia distribución, dependiente de la presencia de animales infectados, condiciones ambientales favorables, presencia de huevos o larvas en el ambiente y contaminación fecal en el suelo². En el hombre, la helmintiasis intestinal puede deberse a la presencia aislada o combinada con otros parásitos (*Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*); algunos nematodos intestinales de origen animal que pueden infestar al hombre en forma accidental (*A. ceylanicum*, *A. caninum*, *A. braziliense*, *A. japonicum* y *Uncinaria stenocephala*). Mientras que en perros *Ancylostoma caninum*, *Toxocara canis*, *Dipylidium caninum* y *Echinococcus granulosus* tienen implicaciones zoonóticas de importancia en lugares donde no existen programas de control contra helmintos en perros. *Ancylostoma caninum* es el parásito que se encuentra con mayor frecuencia en poblaciones de perros callejeros.

En México existen niveles de parasitismo que fluctúan entre el 40 y 100% en zonas rurales y entre 24 y 75% en zonas urbanas siendo *Ancylostoma caninum* más frecuente que *Toxocara canis* en muchos casos. Resulta más frecuente su presencia en perros menores de un año y esporádicamente en gatos; existiendo una relación directamente proporcional entre la presencia del parásito y el aumento de la precipitación pluvial de la zona³.

2.2. Epidemiología

Ancylostoma caninum es de distribución cosmopolita, si bien es más frecuente en áreas tropicales y subtropicales, en perros de climas templados; infectando igualmente humanos representando una causa grave de morbilidad, particularmente en niños y mujeres embarazadas en países en desarrollo. *Ancylostoma caninum* es la especie más distribuida del género *Ancylostoma*,



además es uno de los parásitos gastrointestinales más patogénicos para los perros. Las típicas secuelas mórbidas incluyen debilidad, anemia y una infección crónica sostenida puede llevar a la muerte.

Es endémico, afectando especialmente a perros menores a un año que son los más susceptibles, las infecciones más graves las adquieren los neonatos por la vía de transmisión lactogénica y transplacentaria ²⁰.

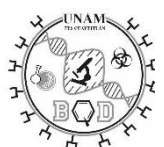
Este nematodo representa un riesgo considerable para la salud pública, porque puede infectar humanos produciendo el Síndrome de Larva Migrans Cutánea ¹⁰.

La forma infectiva para el hospedero definitivo es la larva de tercer estadio ³⁶ los huevos embrionados y larvas son las fases infectantes que sobreviven por periodos prolongados en suelo húmedo y son dispersadas por las lluvias. Las hembras maduras depositan alrededor de 16,000 huevos por día, los cuales necesitan temperatura, humedad y oxigenación óptima para el desarrollo de la Larva I que pasa por el segundo estadio y origina a las Larvas III (L3) que sobreviven en condiciones adecuadas de humedad pero son sensibles a temperaturas extremas y sequía. Adicionalmente un clima húmedo aumenta la supervivencia de las fases infectantes del parásito en perros y gatos lo que permite la dispersión de heces contaminadas y el riesgo de contagio a humanos ¹³ para el caso de migración larvaria cutánea, se requiere de una temperatura de 29 °C y humedad por encima de 87 %.

Dentro de las modalidades de transmisión y vías de ingreso se encuentran la vía oral, cutánea, lactogénica y transplacentaria, así como un factor de riesgo de transmisión de carácter ocupacional, para las personas en contacto con tierra húmeda, arena y animales ⁵.

El medio ambiente y su contaminación juegan un papel importante, cuando los perros frecuentan lugares con hierba o vegetales que retienen la humedad, la cual protege a las larvas de la luz solar creando condiciones favorables para su preservación y desarrollo. En los humanos las deficiencias en la infraestructura sanitaria favorecen la acumulación de excretas y el fecalismo permite diseminar la infección entre individuos y animales con implicaciones zoonóticas.

La mayoría de los helmintos con potencial zoonótico son considerados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como causa de muchas de las Enfermedades Olvidadas o Desatendidas debido al impacto causado en la salud humana y el papel del animal poliparasitado como reservorio principal lo cual resulta un impedimento para controlarlas. Los perros, por lo tanto funcionan como reservorios de las infecciones humanas por lo que debe de considerarse la administración masiva de medicamentos como medida de control para controlar la ancilostomiasis en la población humana ⁴⁵. Un estudio de incidencia global de enfermedades calculó la magnitud de la pérdida de salud debido a enfermedades y lesiones; en el caso de las helmintiasis transmitidas por el suelo determinaron que 819 millones de personas están infectadas con *Ascaris*, 464 millones con *Trichuris* y 438 millones con *Ancylostoma*.



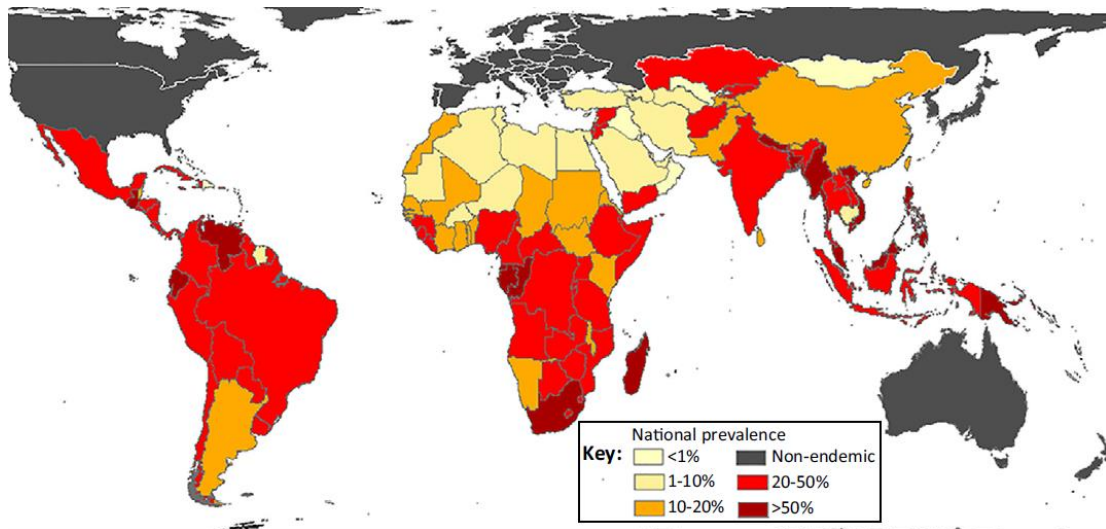


Imagen 1. Distribución global de las helmintiasis transmitidas por el suelo en 2010. Obtenido por Global Atlas of Helminth Infection, para obtener estimaciones globales de los geohelminthos (*Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Necator americanus* y *Ancylostoma* ⁶ .

El Síndrome de Larva Migrans Cutánea es endémico en comunidades pobres en países en desarrollo, especialmente en Brasil, India y las Antillas. Ocurre esporádicamente o como pequeñas epidemias en países desarrollados o bien en turistas que han visitado zonas tropicales. La infestación es frecuente en áreas donde abundan perros y gatos callejeros, donde las mascotas no son desparasitadas. Además, durante la época de lluvia se presenta un pico de incidencia en la ancilostomiasis y el Síndrome de Larva Migrans Cutánea¹⁸ .

2.3. Morfología

Se les denomina gusanos ganchudos ya que su extremo anterior es curvo dorsalmente, el cuerpo es cilíndrico y de coloración grisáceo o rojizo, miden de 8-11 mm de longitud y 340-390 μm de diámetro, con espículas de 730-960 μm el macho y 10-13 mm de largo y diámetro de 500-560 μm la hembra²¹ . Poseen una gruesa cutícula blanquecina y un tubo digestivo que se inicia en una cápsula bucal¹ bordeada con un par de placas cuticulares dorsales, cada una de ellas con tres dientes afilados de los cuales el más externo es el más grande; hay un par de dientes triangulares dorsal y centralmente dentro de la cápsula bucal¹⁶ .



Imagen 2 Cápsula bucal de *Ancylostoma caninum* 1550x. (Ivana Ferreira, 2015). Se observan las placas cuticulares y los tres pares de dientes cortantes⁴⁶.

El macho presenta en el extremo posterior una dilatación en forma de campana, conocida como bolsa copuladora, que es ancha y traslúcida, y presenta espículas para fijarse en el momento de la copula; la bolsa está muy desarrollada, las costillas o radios se disponen de la forma característica de la especie. La vulva está cerca del tercio medio y posterior del cuerpo¹⁶.

En la Imagen 4 se puede distinguir entre la morfología de los adultos en función de su sexo, en el macho se presenta la espícula mientras que la hembra presenta el extremo en punta, Cabe resaltar el aumento de tamaño gradual que presenta la larva desde el estado rabaditiforme, pasando por el filariforme hasta alcanzar la madurez.

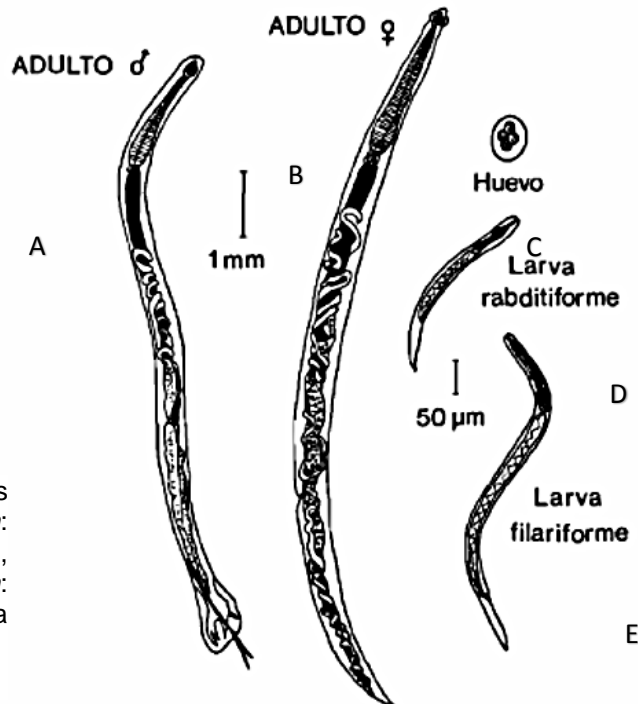


Imagen 3. Esquema de las fases adultas de *Ancylostoma caninum*: Esquema Macho (A), Hembra (B), huevo (C) y estadios de *A. caninum*: larva rabaditiforme (D) y larva filariforme (E)³⁵

2.4. Ciclo biológico

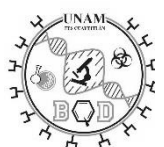
A. caninum tiene un ciclo biológico directo, los cánidos infectados eliminan huevos con la materia fecal. Las hembras producen y liberan aproximadamente 16000 huevos al día, los huevos (65-75 μm por 35-40 μm de anchura) que poseen entre 6 y 8 blastómeros están delimitados por dos paredes externas translúcidas; ¹ los huevos se embrionan en su interior, en condiciones adecuadas se desarrolla la Larva 1, que muda dos veces, se desarrolla en un día alimentándose de bacterias para llegar al segundo estadio larvario, ambas fases con esófago rabadiforme, hasta convertirse en L 3 en el lapso de una semana en condiciones favorables y a una temperatura de entre 15 a 37°C, en esta fase se conserva la muda anterior como protección y ya no se alimenta³⁷; mide aproximadamente 630 μm , esta es la fase infectante del parásito que será ingerida o penetrará la piel⁹.

Existen cuatro formas de infección:

- a) *Vía Oral*. Las L3, se ingieren, el desarrollo larvario dentro del hospedero es variable, pueden realizar dos mudas en la mucosa del intestino delgado, la larva penetra las glándulas gástricas y de la mucosa intestinal, así como las criptas de Lieberkhun, a esta etapa evolutiva se le denomina fase histotrófica²¹, permaneciendo las larvas unos días, tras de los cuales regresan al lumen, tres días posteriores a la infestación mudan a Larva 4, a las cinco semanas se convierten en adultos, o bien alcanzan el aparato circulatorio desde la mucosa oral, migrando por los pulmones y tráquea regresando al intestino, en un periodo de 2 días a 1 semana⁹.

La patencia se alcanza entre 15 y 18 días. Al llegar al intestino comienzan su alimentación, cortando con sus dientes la mucosa e introduciendo su cápsula bucal en ella. El tejido es digerido por acción enzimática, posteriormente consume sangre que es deglutida y sometida a la acción de polipéptidos anticoagulantes de *Ancylostoma* (ACAP) ⁴², producidos por la glándula cefálica afectando el sistema de coagulación e inhibiendo la actividad plaquetaria hasta por 13 minutos como consecuencia de las mordeduras. Posteriormente cambian de posición en la mucosa para continuar su alimentación en otro sitio del intestino. La máxima pérdida de eritrocitos precede al comienzo de la producción de huevos, en cuyo momento las necesidades nutritivas de la hembra son máximas. Macroscópicamente la sangre comienza a aparecer en las heces en el día 8, y alcanza un máximo alrededor del día 25.

- b) *Vía Cutánea*. Las Larvas 3 penetran a través del folículo piloso, migrando hacia la dermis e hipodermis, por su abundancia en capilares sanguíneos y linfáticos son transportadas al corazón y pulmones. Las larvas penetran los alvéolos y migran hacia los bronquiolos, bronquios y tráquea donde se convierten en Larvas 4, son deglutidas y maduran en el intestino delgado alrededor del sexto día. Los órganos reproductores se evidencian en los



gusanos adultos aproximadamente al día 12 y alcanzan la madurez unos 17 días después de la infestación, estos adultos tienen una vida media de 6 meses. La excreción de huevos mediante las heces se presenta en la semana 2 ó 3 post-infección vía oral, y alrededor de la 4 semana en infección percutánea⁹. El estado de dormancia de Larvas 3 ocurre en la hipodermis y músculo estriado hasta la relajación de la inmunidad en el momento del parto, en el caso de las hembras²⁰.

- c) *Vía Transplacentaria*: En perras gestantes, las larvas permanecen latentes en el hígado hasta que los cachorros nacen, posteriormente inician la migración pulmonar, llegando al intestino y alcanzando su madurez mientras los cachorros son aún muy jóvenes, los cuales eliminarán los huevos entre 10 a 12 días posteriores³⁷.
- d) *Vía Lactogénica*: Las larvas que están en glándula mamaria penetran en las cisternas lácteas, desde donde pasan con el calostro y la leche de los cachorros, en un período de 3 semanas²⁰.

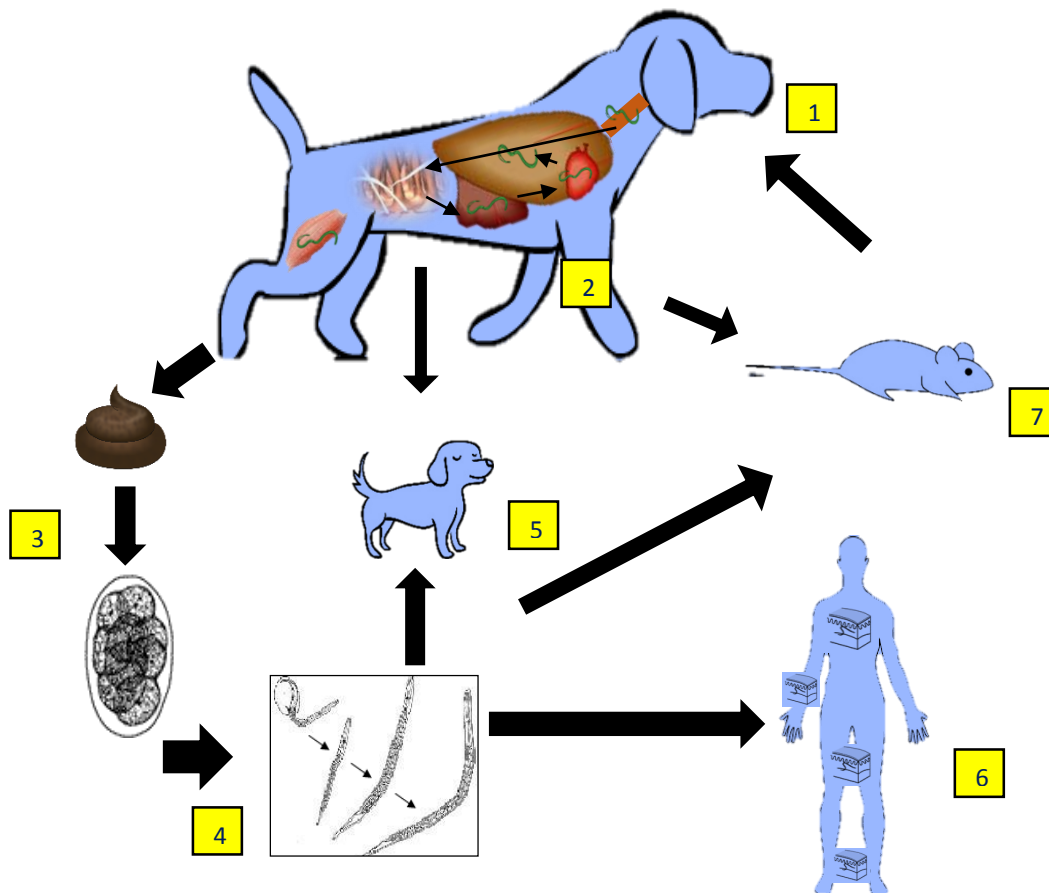


Imagen 4. Ciclo biológico *Ancylostoma caninum* 1) Transmisión oral a hospedero principal. 2) Migración compleja y enquistamiento. 3) Expulsión de heces contaminadas. 4) Desarrollo larvario. 5) Transmisión lactogénica y transplacentaria. 6) Transmisión cutánea. 7) Transmisión oral a hospedero paraténico. Modificado de Quiroz 2006.

2.5. Patogenia

Las larvas ejercen acción traumática en piel, pulmón e intestino en su migración, así como acción expoliatriz de carácter histófaga y hematófaga, mientras que la acción bacterífera es importante por la inoculación de bacterias piógenas en el trayecto cutáneo tanto en el momento de la migración como en el Síndrome de Larva Migrans Cutánea, en el humano provocan dermatitis con infección piógena. La acción antigénica de las larvas debido a la muda y a productos de excreción-secreción da lugar a una respuesta inmune causando sensibilización y resistencia³⁴.

El parásito adulto ejerce acción traumática en el intestino al morder la mucosa, la acción expoliatriz es histófaga y tiene lugar al digerir el tapón de la mucosa, lo que da lugar a la acción hematófaga al utilizar sangre como alimento. El hematocrito en cachorros con 8 a 27 gusanos se reduce entre 15 y 35 %, si se duplica de 30 a 64 el número de gusanos, disminuye del 38 al 45%, Es importante mencionar que la infección con *Ancylostoma caninum* estimula la eritropoyesis. La pequeña úlcera producida esta infiltrada de anticoagulantes y enzimas proteolíticas, que ocasionan el sangrado continuo a pesar de que el parásito haya cambiado de zona de anclaje³³. Dichas proteasas están relacionadas con la écdisis, invasión tisular, destrucción de tejidos y degradación de la mucosa. También se han identificado un factor inhibidor de la adhesión de neutrófilos activados, dos anticoagulantes principales inhibidores de serinproteasas, un péptido anticoagulante de *A. caninum* 5(*AcAP5*), un potente y específico inhibidor del Factor Xa⁶.

Estas moléculas causan una pérdida crónica de sangre intestinal y alargan la duración de las hemorragias, retardan la formación del coagulo generando la pérdida de proteínas séricas y hierro, causando una inflamación intestinal durante meses, años o décadas de acuerdo con la especie. Las infecciones crónicas afectan a individuos de todas las edades y frecuentemente conllevan a secuelas secundarias como la deficiencia de hierro, retardo en desarrollo físico principalmente en regiones tropicales y pobres con hábitos deficientes de nutrición²⁶. Se producirá una anemia ferropénica de carácter agudo o crónico, dependiendo de la intensidad de la infección, la edad del hospedero, su estado de nutrición, el nivel de reservas de hierro y el grado de inmunidad. La pérdida de sangre se inicia a los 8 días postinfección, cuando se ha desarrollado la cápsula bucal que permite a los ejemplares todavía inmaduros fijarse profundamente a la mucosa intestinal, hasta alcanzar los vasos sanguíneos, originando ruptura de capilares y hemorragias. Al comienzo de la infección, la anemia inducida es de naturaleza normocítica-normocrómica; no obstante, a medida que se van agotando las reservas de hierro del hospedador, se torna hipocrómica y microcítica, debido a que cada gusano provoca pérdidas de 0.2 ml de sangre por día las infecciones crónicas en niños frecuentemente conllevan a una secuela secundaria de deficiencia de hierro incluyendo retardo en crecimiento y desarrollo cognitivo¹.

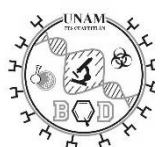
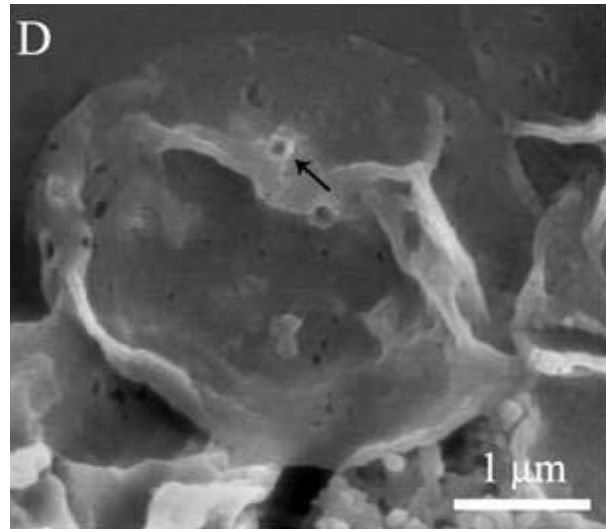


Imagen 5. Formación de poros en eritrocitos caninos inducidos por hemolisinas de *Ancylostoma caninum*. Microscopía Electrónica de Barrido¹².



Las lesiones a nivel tisular ocasionan inflamación con infiltración leucocitaria formada por polimorfonucleares, islotes de necrosis, atrofia de folículos pilosos, sebáceos, supuración y las lesiones pulmonares incluyen zonas inflamadas en el parénquima en la zona subpleural. En el periodo de invasión larvaria hay eosinofilia. En la fase intestinal la principal lesión es la anemia y caquexia, el duodeno y yeyuno presentan enteritis con formación de petequias en la zona de fijación del parásito, histológicamente hay infiltración linfocitaria y de macrófagos con eosinófilos, en el punto de fijación hay necrosis con gránulos picnóticos. Los ganglios linfáticos superficiales y mesentéricos están hipertrofiados y presentan parénquima blando e infiltrado. Otros órganos afectados son el corazón que se observa pálido, hipertrofiado, dilatado, con paredes blandas y flácidas, en tanto, los riñones presentan nefritis difusa, parenquimatosa e intersticial, además se observa presenta hepatitis degenerativa¹³.

En el caso del Síndrome de Larva Migrans Cutánea, la comezón inicia poco después de que la larva ha penetrado la epidermis y aparece una pápula rojiza, desencadenado por la estimulación de las fibras por sustancias liberadas por la larva. Algunos de los procesos histopatológicos incluyen una dermatitis difusa con acantosis, focos de espongirosis con vesículas intraepidérmicas que contienen queratinocitos necróticos. Tanto en la dermis superior y media se observan infiltrados inflamatorios de predominio eosinofílico¹³.

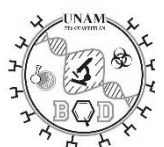
La infección por *A.caninum* puede causar enteritis eosinofílica, caracterizada por dolor abdominal asociado a diarrea y náuseas, en infestación masiva se ha descrito la invasión de musculo esquelético por parte de las larvas¹⁴.

La ancilostomiasis crónica se asocia a que el parásito disponga de las condiciones ideales para permanecer en el hospedero tales como: vida prolongada, alta fecundidad, fácil transmisión y patogenicidad e inmunogenicidad limitada, invasión, colonización y toxicidad, además de que induce anergia en el hospedero y una hiporespuesta inmune¹⁸.

Actualmente se ha demostrado que estos organismos presentan un importante potencial inmunomodulador y pueden tener un importante efecto bloqueador de los efectos de alergias y trastornos inmunológicos que son cada vez de mayor frecuencia en el mundo desarrollado actual, una posible explicación se asocia a los hábitos higiénicos presentes en la población que llevan a una baja exposición a patógenos, lo que resulta en el incremento de desórdenes inmunes y condiciones de inflamación crónica, tales como asma y colitis. En el asma se presenta una respuesta inmune tipo Th2, caracterizada por eosinofilia, con valores elevados de IL-4,5,9, 10 y 13, IgE de alta especificidad antigénica, incremento en la producción de moco, obstrucción e hiperreactividad. Las colitis se dividen en Enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa, caracterizadas por respuesta Th1, IL-12, e IFN; la segunda, es una respuesta Th2, mediada por IL-4, 5 y producción de anticuerpos. Las helmintiasis, así como la ancilostomiasis, se asocian a una respuesta inmune Th2, altos niveles de IgE, eosinofilia, y mastocitosis, al igual que las alergias y el asma. Por lo que el hecho de presentar un cuadro de helmintiasis podría modular la respuesta Th2, influyendo en la respuesta alérgica o inflamatoria.

Se han hecho experimentos con *Necator americanus*, *Trichuris suis*, *A. ceylanicum* y *A. caninum*, a partir de este último se han extraído al menos dos moléculas empleadas en ensayos clínicos como agentes terapéuticos uno de ellos es el *Factor Inhibidor de Neutrofilos* (NIF, por sus siglas en inglés) y otro el *Péptido Anticoagulante de Nemátodo c2* (NAPc2, por sus siglas en inglés) obteniendo resultados favorables, sin embargo todavía hay muchas interrogantes por contestar.

El parásito ideal es aquel que tiene una vida larga, alta fecundidad, fácil transmisibilidad y limitada patogenicidad o inmunogenicidad, características que posee *Ancylostoma*, se sabe que una relación exitosa hospedero-parásito se basa reducir al mínimo su impacto (pudiendo llegarse a considerar una relación de comensalismo), donde el parásito causa un daño muy pequeño o nulo al hospedero, por lo que se puede sugerir la posibilidad de mutualismo ya que el hospedero recibiría algún beneficio del parásito, en este caso la regulación de la respuesta inmune disminuyendo la presencia de inflamación crónica, aunque a todos estos elementos debemos agregarles otra variable que es la condición nutricional del hospedero, la cual a su vez repercutirá en la condición de inmunidad y se agravará cuando hay una carga parasitaria importante⁴².



2.6. Larva migrans cutánea

Otra de las consecuencias por la infección del parásito es el síndrome de Larva Migrans Cutánea (LMC) causado por la presencia y subsecuente migración de larvas en capas superficiales y/o profundas de la piel. Constituye una de las dermatosis zoonóticas más frecuentes en zonas tropicales y subtropicales. Los principales agentes etiológicos en nuestro país son *Ancylostoma caninum* y *Ancylostoma braziliense*.

La Larva 3 de *A. caninum* responde a la vibración del suelo e incremento de temperatura con movimientos serpenteantes. El movimiento característico ayuda a la larva a encontrar al hospedero, este comportamiento ondulante es estimulado por el dióxido de carbono en el aire y por el gradiente de temperatura. Una vez localizado el hospedero, la larva se arrastra en la superficie de la piel en busca de un sitio penetrable, eventualmente la capa corneal de la epidermis; secreta proteasas y hialuronidasa que le permite atravesar la piel.

En el hospedero animal la larva penetra el sistema linfático y circulatorio y causa ancilostomiasis intestinal. Sin embargo en seres humanos se autolimita persistiendo por meses y rara vez por años, la larva queda confinada a la piel y no completa el ciclo biológico¹⁹.

Las zonas corporales afectadas con mayor frecuencia son el dorso y planta de los pies, manos, glúteos, área anogenital, tronco, muslos y piernas. Horas después de la penetración aparece una pápula pruriginosa. En el transcurso de días o semanas y a una distancia aproximada de 1-2 cm de la primera lesión la migración de las larvas da lugar a trayectos protuberantes, sinuosos, únicos o múltiples, de acuerdo al número de parásitos, con pápulas, vesículas, descamación y eritema. El cuadro se resuelve en unas semanas ya que el 20 - 80% de las larvas muere en el transcurso de 2 - 8 semanas, La contaminación con bacterias en estas lesiones es frecuente, así como la dermatitis por contacto por automedicación con remedios tópicos¹³.

El diagnóstico es clínico debido a la presencia de la presencia de la línea serpigínea que avanza en la piel, asociada a comezón y antecedentes de exposición¹³.

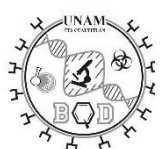




Imagen 6. Lesión asociada a Larva Migrans Cutánea en pie. Ampolla y larva ¹³.

2.7. Tratamiento

Contra las fases adultas se han empleado una variedad de fármacos como pamoato de pirantel o febantel que pertenecen al grupo de las tetrahidropirimidinas en dosis de 5 a 14 mg/Kg, cuya eficiencia ha sido probada en gusanos adultos empleándose dosis bajas durante tres días puede ser más eficaz que emplear una dosis alta por una sola ocasión, sin embargo al tratarse de una familia antigua de antiparasitarios se ha demostrado que presentan resistencia ²⁵.

Los bencimidazoles son antiparasitarios de gran espectro con buen margen específico contra nematodos sobre todo gastrointestinales, pero algunos de ellos pueden abarcar en su espectro efectos nematocidas, cestodicidas, trematodicidas, larvicidas y ovicidas. Según su presentación puede ser inhibidores de la polimerización de la tubulina y fumarato reductasa o bien, bloquean el transporte de glucosa. En este grupo químico se encuentra el albendazol considerado altamente eficaz contra nematodos, tanto contra formas adultas como larvarias, utilizado en dosis de 15 a 50 mg/Kg. Otro principio de esta familia es el mebendazol utilizado para el control de nematodos y especies de *Taenia* en perros y gatos, en un régimen de tres días, a dosis altas es depresor del sistema nervioso central y puede ser teratogénico, en humanos resulta eficaz empleando una sola dosis de 500 mg, con un espectro que puede incluir el tratamiento de ancilostomiasis, enterobiosis, ascariosis, tricurosis y capilariasis. El fenbendazol, se ha usado extensamente en ganado, caballos, perros, gatos y humanos; con dosis en perros de 10 a 50 g/Kg contra *Ascaris*, *Ancylostoma*, *Uncinaria*, *Trichuris* y *Taenia pisiformis* ^{25 32}.

Entre los fármacos empleados también está la familia química de las lactonas macrocíclicas, uno de los representantes más conocidos incluye a la ivermectina. Este principio químico está formado por una mezcla del componente H₂B_{1a} (5-O-demetil 22,23-dihidroaverectina A_{1a}) y del componente H₂B_{1b} (25-(1-metiletil)-5-O-demetil-25- de (1-metilpropil)-22,23 dihidroavermectina A_{1a}). En una proporción de H₂B_{1a} equivalente al 90% y la suma de ambos componentes 95% sobre la base seca de la sustancia.

Este grupo químico fue obtenido de la levadura *Streptomyces avermitilis*, que corresponde a un potente antiparasitario, activo contra ectoparásitos (insectos y arácnidos), y una muy amplia gama de nematodos gastrointestinales, pulmonares e incluso sanguíneos, la dosis recomendada corresponde a 200 µg/kg de peso con algunas excepciones.

La ivermectina es una droga semisintética que se presenta como un polvo cristalino de color blanco a amarillento e higroscópico. Que es prácticamente insoluble en agua; soluble en alcohol; libremente soluble en diclorometano. Se debe almacenar protegido del aire y de la luz.

El fármaco requiere de alcanzar una concentración determinada a nivel plasmático para poder provocar la parálisis y muerte de los parásitos, ya que su mecanismo de acción estimula la liberación del ácido gamma-aminobutírico (GABA) de las terminales nerviosas fortaleciendo su unión a los receptores postsinápticos, bloqueando la transmisión química a través de la sinapsis nerviosa que utiliza canales aniónicos dependientes de glutamato o canales de cloro dependientes de GABA, lo que interrumpe el estímulo excitatorio en las sinapsis interneuronales de los nemátodos y en la unión neuromuscular de los artrópodos. Ese efecto particularmente se ha observado sobre la musculatura de la faringe de los nematodos por lo que los organismos mueren al no poderse alimentar ²⁴.

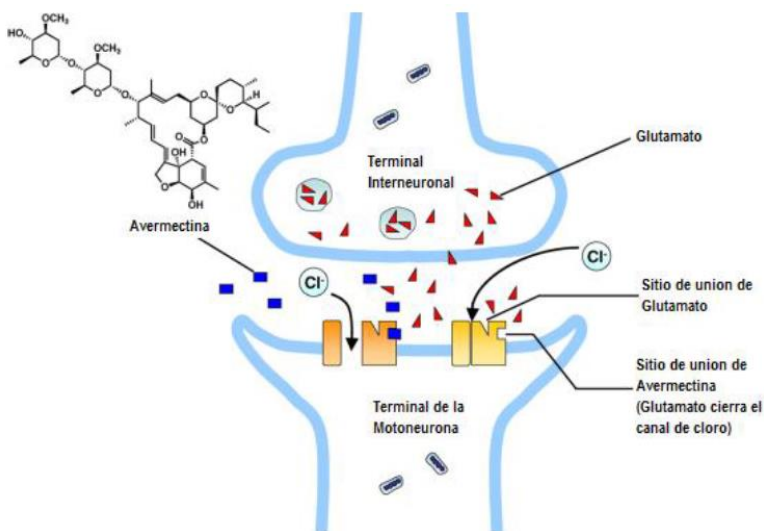


Imagen 7. Mecanismo de acción de las avermectinas en la sinapsis del nematodo ³⁰.

Farmacocinéticamente es absorbida en el torrente sanguíneo y distribuida ampliamente a través de los tejidos del cuerpo independientemente de la vía de suministro ²⁴, acumulándose en mayor concentración en tejido adiposo y en hígado, donde se metaboliza parcialmente. Finalmente el fármaco y sus metabolitos se excretan principalmente en las heces, menos del 1% se elimina en orina como ingredientes activos, por esta razón los residuos del fármaco son fuente de contaminación ya que pueden afectar a algunos organismos en el suelo.

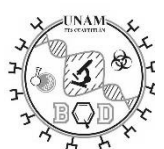
La ivermectina tiene amplio margen de seguridad. No obstante, su administración puede dar lugar a efectos tóxicos; la mayoría de ellos derivan de la sobredosificación del compuesto, aunque también se han descrito a dosis terapéuticas casos de susceptibilidad extrema a los efectos neurotóxicos del fármaco en determinadas razas o subpoblaciones caninas sobre todo, así como reacciones anafilácticas por la destrucción masiva de parásitos⁴⁰.

Entre los nemátodos susceptibles a la ivermectina se encuentran: *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Trichuris thichiura*, *Strongyloides stercoralis*, *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Mansonella perstans* y *ozzardi*, *Onchocerca volvulus* y es el tratamiento de elección para eliminar fases larvianas de *Gnathostoma spinigerum*. Se está estudiando como posible tratamiento de pediculosis, como sustituto de la aplicación tópica de insecticidas. Un estudio *in vitro* y en animales demostró que la ivermectina mata los huevos y a las fases ninfales y adultas de los piojos. La ivermectina es efectiva contra una amplia gama de especies de piojos de los animales; además se ha observado que una sola dosis vía oral de ivermectina es completamente efectiva para escabiosis²⁴.

Para evitar dichos problemas en futuros tratamientos con este fármaco, se están implementando nuevos métodos de aplicación y absorción, siendo el caso de la ivermectina al 0.5% en emulgel.

Dada la prevalencia de *A. caninum* en las poblaciones caninas y considerando a los hospederos susceptibles y la gravedad de las manifestaciones secundarias de la zoonosis descritas anteriormente es importante impulsar la investigación para el lanzamiento de nuevas opciones terapéuticas que sean accesibles para los más vulnerables.

Debido a esto, el presente trabajo pretende contribuir al estudio de la efectividad de nuevas formulaciones a base de ivermectina contra parásitos que infectan a gran cantidad de animales en el mundo, mediante un producto de fácil aplicación, que contribuya al mejoramiento de la salud pública.



3. Objetivos

3.1. General

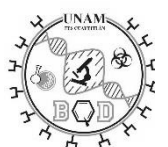
Contribuir al estudio de la efectividad de nuevas formulaciones de antiparasitarios para el combate de las parasitosis que regularmente afectan a los caninos y eventualmente humanos, empleando antiparasitarios en variantes de fácil aplicación, estableciendo de esta manera nuevas opciones de tratamiento.

3.2. Particular

Evaluar la actividad antiparasitaria de una formulación de Ivermectina al 0.008% en emulgel aplicada contra larvas enquistadas de *Ancylostoma caninum* en un modelo experimental en ratones machos CD1 adultos con infección inducida.

4. Hipótesis

Si la formulación como emulgel de ivermectina al 0.008% es un eficaz antiparasitario a nivel intestinal, dada su forma de aplicación y mecanismo de acción reducirá el número de fases larvianas presentes en los animales sometidos a tratamiento.



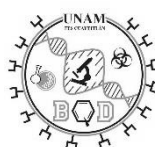
5. Materiales y Metodología de la investigación

5.1. Material y equipo de laboratorio

- Asa parasitológica
- Balanza analítica
- Balanza granataria
- Bisturí
- Cajas Petri de vidrio
- Centrifuga – Cole Parmer
- Coladores
- Cubreobjetos
- Charolas de disección
- Estufa bacteriológica- Convección por gravedad E-33
- Gasas 8x8 cm
- Jeringa para insulina
- Microscopio estereoscópico –Leica Zoom 2000
- Microscopio óptico- Olympus CHT
- Micropipeta
- Mortero
- Pinzas de disección
- Pipeta Pasteur
- Pipeta graduada
- Piseta
- Portaobjetos
- Probeta
- Sonda gástrica
- Tijeras de disección
- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitado

5.2. Reactivos y soluciones

- Agua destilada
- Emulgel de ivermectina al 0.008% (combinación de gel y emulsión de liberación controlada con agua y carbómero como vehículo)
- Formol al 10%
- Jugo gástrico artificial (6 ml de HCl concentrado y 6 g de Pepsina, por cada litro de agua)
- Solución de NaCl saturada
- Solución Salina Fisiológica al 0.9%



5.3. Material Biológico

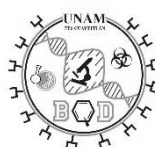
Fueron empleados 70 Ratones machos cepa CD1 de tres meses de edad, obtenidos de la colonia del laboratorio de Parasitología de la FESC separados en 7 lotes, que se mantuvieron en el Laboratorio de Parasitología de la FES Cuautitlán, en condiciones nutricionales adecuadas *ad libitum* como agua corriente y alimento Rodent Laboratory Chow PMI Nutrition International

Dentro de las jaulas se colocó una cama de viruta de madera que fue cambiada dos veces por semana y desechada en bolsas amarillas destinadas al incinerador como lo indica la NOM-062-ZOO-1999, NOM-062-ZOO-1999, NOM-087-ECOL-SSA1-2002 y NOM-062-ZOO-1999.

Además se utilizaron 35, 000 Larvas 3 de *Ancylostoma caninum*

5.4. Obtención de larvas infectantes de *Ancylostoma caninum*.

Empleando a tres perros donados por particulares, se les desparasitó e instaló en jaulas dentro de las instalaciones de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la FES Cuautitlán, fueron mantenidos con agua y comida *ad libitum* y limpieza diaria, de acuerdo a los lineamientos correspondientes en la NOM-062-ZOO-1999, NOM-062-ZOO-1999, NOM-087-ECOL-SSA1-2002 y NOM-062-ZOO-1999. Posteriormente se les indujo la infección mediante 100 larvas de *A. caninum*, con la finalidad de asegurar una monoinfección y la producción de huevos de *Ancylostoma caninum*. Una vez establecida la infección se comprobó el parasitismo mediante la técnica coproparasitoscópica de flotación, la cual fue usada además para concentrar grandes cantidades de huevos mediante el asa parasitológica y se depositaban en agua creando una suspensión, posteriormente se realizaron 3 lavados de la suspensión con agua corriente y se dejaron sedimentar para eliminar residuos de Cloruro de Sodio. Transcurridos 25 minutos de sedimentación el material obtenido se colocó en cajas Petri con agua y una solución de Enterobacterias obtenidas de heces de ratón que sirvieron como alimento de los estadios larvarios. Dicho cultivo se mantuvo en estufa bacteriológica a 25° C para inducir el desarrollo al tercer estadio larvario (L-3). Tras un período de cinco días se verificó la presencia y desarrollo de las larvas infectantes al observar al microscopio estereoscópico de las cajas. Para reunir alrededor de 35000 larvas infectantes, se realizaron una gran cantidad de cultivos a lo largo de 4 meses cuidando las variaciones en concentraciones de cloro, sal, temperatura, humedad, huevos por cultivo y alimento apropiados para su desarrollo.



Para asegurar una viabilidad del 65% en cada cultivo, se realizó el conteo de diez alícuotas de 100 µl para determinar el promedio de larvas viables presentes en cada cultivo y así se determinó el volumen de inóculo a utilizar para la infección de los ratones.

5.5. Inoculación.

La inoculación se llevó a cabo por vía oral mediante una sonda gástrica para alimentación de prematuros (tipo Foley), de un concentrado de Larvas 3, inoculando en promedio 500 estadios larvarios. Se administró 1 mililitro de la suspensión larvaria, en dos sesiones, es decir 0.5 mililitros en cada una.

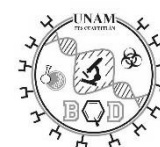
5.6. Formación de lotes de ratones de experimentación.

Tabla 1. Distribución de lotes de experimentación.

Lote	Descripción
1	10 animales inoculados y no tratados (Control Positivo).
2	10 animales no inoculados y no tratados (Control Negativo).
3	10 animales tratados el día de la inoculación con sacrificio a los 30 días.
Animales tratados 30 días posteriores a la inoculación	
4	10 animales con un tratamiento y sacrificio a los 30 días.
5	10 animales con dos tratamientos y sacrificio a los 60 días.
6	10 animales con tres tratamientos y sacrificio a los 90 días.
7	10 animales con cuatro tratamientos y sacrificio a los 120 días.

5.7. Sacrificio humanitario de ratones

Cumplidos los 30, 60, 90 y 120 días posteriores al tratamiento los lotes de animales fueron sacrificados por dislocación y disecados extrayendo los siguientes órganos: bazo, cerebro, corazón, hígado, músculo esquelético (muslo derecho), pulmones y riñones. Estos órganos y tejidos fueron fragmentados finamente por medio de tijeras y posteriormente depositados en una gasa de 8x8 cm e introducidos en un tubo de ensayo conteniendo 10 ml de jugo gástrico artificial (6 ml de HCl concentrado y 6 g de Pepsina, por cada litro de agua), una



vez depositados los tejidos en el interior de los tubos contenidos en gradillas de alambre, se introdujeron en una estufa de cultivo en la que permanecieron por 24 horas, pasado este lapso se extrajo la gradilla y las gasas contenidas en los tubos fueron agitadas por medio de pinzas de disección y depositadas nuevamente por otras 24 horas en la estufa de cultivo; pasado este tiempo retiradas nuevamente, sometiendo las muestras a una segunda agitación, centrifugando la muestra a 3,500 rpm para posteriormente retirar el sobrenadante y sustituirlo ahora con formol al 10% como conservador, agitando la muestra nuevamente para homogeneizar la mezcla y posteriormente fueron almacenados en refrigeración a 4°C hasta su revisión.

5.8. Búsqueda de larvas de *Ancylostoma caninum*.

Para la observación de los sedimentos se depositó aproximadamente entre 300 y 400 microlitros de sedimento entre porta y cubreobjetos, revisando al microscopio óptico y llevando a cabo el conteo respectivo de larvas en cada uno de los órganos hasta terminar con la revisión del sedimento total en cada una de las muestras. Tal procedimiento se efectuó con cada uno de los lotes de experimentación.

5.9. Disposición de Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI)

Los cadáveres de los ratones se depositaron en una bolsa roja y se llevaron al incinerador de las instalaciones de la FES Cuautitlán de acuerdo con la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

6. Antiparasitario

Se calculó el promedio del peso corporal de los ratones para determinar la dosis a aplicar

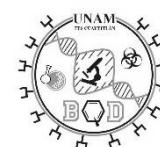
Tabla 2. Pesos corporales de los ratones.

Ratón	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Peso corporal (gramos)	38.9	38.7	40.8	40.5	33.5	40.4	40.0	38.4	38.4	44.9

$$\Sigma = 394.5 \rightarrow \frac{394.5}{10} = 39.45$$

Promedio de peso por ratón = 39.45 g

La dosis a administrar corresponde a 200 microgramos (µg)/kilogramo (kg) de peso.



Por lo tanto:

200 μg -----1000g (1kg) peso

X-----39.45 g peso

X=7.89 μg de ivermectina, corresponde aplicar esta dosis de principio activo

Entonces, si el emulgel está al 0.5%:

100 g -----0.5 g ivermectina

X-----0.00789 g ivermectina

X=1.58 g emulgel se debe aplicar para obtener la cantidad suficiente de ivermectina

Debido a que no había alguna balanza analítica que pudiera medir esa cantidad, se elaboró y proporcionó por el Dr. David Quintanar Guerrero responsable del Laboratorio de Posgrado de Tecnología Farmacéutica una porción de 30g de emulgel específicamente para el proyecto, con la dosis exacta requerida, es decir, 8 μg / 100mg de emulgel

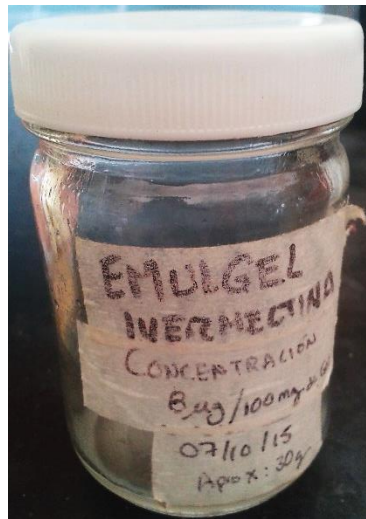
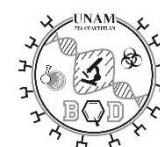


Imagen 8. Emulgel de ivermectina al 0.008 % (Mendoza ,2016)

A continuación, se presenta la composición del emulgel:

Tabla 3. Composición del emulgel de ivermectina.

Componente	Concentración por cada 100 mg
Ivermectina	8 µg
Triglicéridos de cadena media	27.6 g
Polímero POE-POP-POE	5.00g
Glicerina	42.00 g
Trietanolamina	1.10 g
Carbómero	4.72 g
Agua cbp	100 g



7. Resultados

Se procesaron y revisaron 490 muestras correspondientes a siete tipos de tejidos en los 10 ratones que integraban cada uno de los siete lotes.

En el primer grupo de animales revisados que correspondió a los animales inoculados no tratados se detectó un promedio de 2.7 larvas por animal que corresponde a un número muy reducido de organismos implantados después de la inoculación de 500 larvas infectantes, las larvas fueron encontradas en seis de los siete tipos de tejidos estudiados con excepción del cardiaco, este comportamiento indica una tendencia migratoria asociada al tipo de hospedero que es el ratón en el ciclo biológico de este parásito, los tejidos en los que se encontró el mayor número de larvas fueron: el cerebro con 7 larvas, el hígado con 7 larvas y músculo esquelético con 5 larvas. Los tejidos con menor número de larvas fueron el bazo y el riñón con 3 larvas, el pulmón 2 larvas. La suma total de larvas recuperadas de todos los ratones fue de 27 (Tabla 4).

Tabla 4. Larvas de *Ancylostoma caninum* recuperadas de los ratones del Lote 1 animales infectados sin aplicación de tratamiento con gel de ivermectina en dosis de 200 µg/ kg, sacrificados 30 días después de inducirles la infección.

Ratón	Número de larvas por órgano							Σ larvas por ratón
	Bazo	Cerebro	Corazón	Hígado	Músculo	Pulmón	Riñón	
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	2	2
3	0	1	0	1	1	1	0	4
4	0	1	0	0	1	0	0	2
5	1	0	0	0	0	0	0	1
6	0	0	0	0	0	0	1	1
7	0	2	0	2	1	0	0	5
8	1	0	0	2	1	1	0	5
9	0	3	0	0	0	0	0	3
10	1	0	0	2	1	0	0	4
Σ larvas por órgano	3	7	0	7	5	2	3	27
\bar{x}	0.3	0.7	0	0.7	0.5	0.2	0.3	2.7

En el lote número 2 correspondiente al grupo de animales no inoculados y no tratados que se usó como grupo control negativo se pudo verificar la ausencia de larvas de *Ancylostoma caninum* con lo que se demuestra que los animales empleados en la experimentación estaban libres de parásitos (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados obtenidos del Lote 2 de ratones usados como control negativo (no inoculado y no tratado) que fueron sacrificados a los 30 días de iniciar el estudio.

Ratón	Número de larvas por órgano							Σ larvas por ratón
	Bazo	Cerebro	Corazón	Hígado	Músculo	Pulmón	Riñón	
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
Σ larvas por órgano	0	0	0	0	0	0	0	0
\bar{x}	0	0	0	0	0	0	0	0

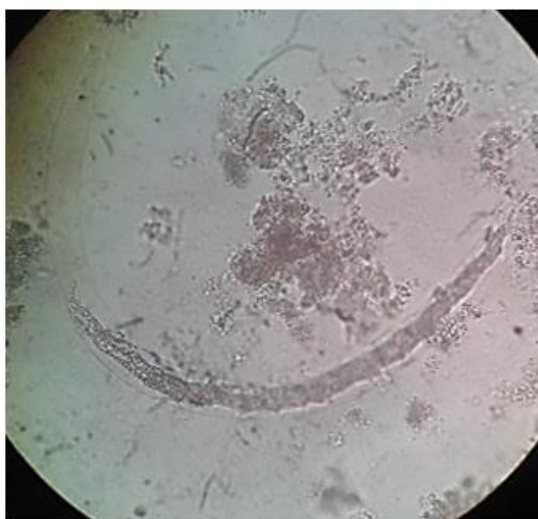


Imagen 9. Fotografía de Larva 3 de *Ancylostoma caninum* recuperada en Lote 1. A partir de la digestión de los tejidos de los animales del grupo de ratones inoculados no tratados 40x (Mendoza, 2016)

En la Tabla 6 se presentan los resultados obtenidos en el lote 3 de animales correspondiente al grupo inoculado y tratado una vez el mismo día con el emulgel de ivermectina y sacrificado 30 días después. En solo uno de los animales integrantes de este grupo se detectó la presencia de una larva a nivel de corazón por lo que el tratamiento efectivamente ejerció un efecto inhibitorio de migración e implantación de larvas de *Ancylostoma caninum*.

Tabla 6. Larvas de *Ancylostoma caninum* recuperadas de los ratones del Lote 3 (Inhibición de la migración) sometidos a un tratamiento con gel de ivermectina en dosis de 200 µg/ kg, sacrificados 30 días posteriores del tratamiento.

Ratón	Número de larvas por órgano							Σ larvas por ratón
	Bazo	Cerebro	Corazón	Hígado	Músculo	Pulmón	Riñón	
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	1	0	0	0	0	1
7	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
Σ larvas por órgano	0	0	1	0	0	0	0	1
$\frac{\Sigma}{x}$	0	0	0.1	0	0	0	0	0.1



Imagen 10. Fotografía de la única Larva 3 de *Ancylostoma caninum* recuperada en Lote 3 . Obtenida del cuerpo de un ratón del lote 3 de ratones (inoculados y tratados con emulgel el mismo día 40X (Mendoza ,2016)

En la Tabla 7 se muestran los resultados del lote cuatro de ratones que corresponde a los animales que fueron inoculados y tratados 30 días después de ser inoculados, en este caso se detectó que dos de los animales presentaron solo una larva en sus cuerpos uno en el cerebro y el otro en bazo.

Tabla 7. Larvas de *Ancylostoma caninum* recuperadas de los ratones del Lote 4 sometidos a un tratamiento con gel de ivermectina en dosis de 200 µg/ kg aplicado 30 días posteriores a la inoculación y sacrificados 30 días después de tratados.

Ratón	Número de larvas por órgano							Σ larvas por ratón
	Bazo	Cerebro	Corazón	Hígado	Músculo	Pulmón	Riñón	
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	1	0	0	0	0	0	1
9	1	0	0	0	0	0	0	1
10	0	0	0	0	0	0	0	0
Σ larvas por órgano	1	1	0	0	0	0	0	2
\bar{x}	0.1	0.1	0	0	0	0	0	0.2



Imagen 11. Fotografía de la Larva 3 de *Ancylostoma caninum* recuperada del Lote 4 (animales inoculados y tratados en un ocasión con Ivermectina sacrificados a los 30 días de tratados).40X (Mendoza,2016)

En la Tabla 8, se muestran los resultados encontrados en los ratones del lote cinco correspondiente a animales inoculados y tratados a los 30 y 60 días, en este grupo solo dos animales presentaron larvas (una en cada caso) una en músculo esquelético y en el otro animal en pulmón.

Tabla 8. Larvas de *Ancylostoma caninum* recuperadas de los ratones del Lote 5 sometidos a dos tratamientos con gel de ivermectina en dosis de 200 µg/ kg, sacrificados a los 60 días después de inoculación.

Ratón	Número de larvas por órgano							Σ larvas por ratón
	Bazo	Cerebro	Corazón	Hígado	Músculo	Pulmón	Riñón	
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	1	0	1
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	1	0	0	1
8	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
Σ larvas por órgano	0	0	0	0	1	1	0	2
$\frac{\Sigma \text{larvas}}{x}$	0	0	0	0	0.1	0.1	0	0.2



Imagen 12. Fotografía de Larva 3 de *Ancylostoma caninum* recuperada en Lote 5, con dos tratamientos recibidos y sacrificio a los 60 días de tratados. 40 x (Mendoza ,2016)

En la Tabla 9, se muestran los resultados encontrados en los ratones del lote seis correspondiente a animales inoculados y tratados a los 30, 60 y 90 días postinoculación, en este grupo solo en uno de los animales se observó una larva a nivel de bazo.

Tabla 9. Larvas de *Ancylostoma caninum* recuperadas de los ratones del Lote 6 tratados a los 30, 60 y 90 días con gel de ivermectina en dosis de 200 µg/ kg, sacrificados a los 90 días después de tratados

Ratón	Número de larvas por órgano							Σ larvas por ratón
	Bazo	Cerebro	Corazón	Hígado	Músculo	Pulmón	Riñón	
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1	0	0	0	0	0	0	1
Σ larvas por órgano	1	0	0	0	0	0	0	1
\bar{x}	0.1	0	0	0	0	0	0	0.1

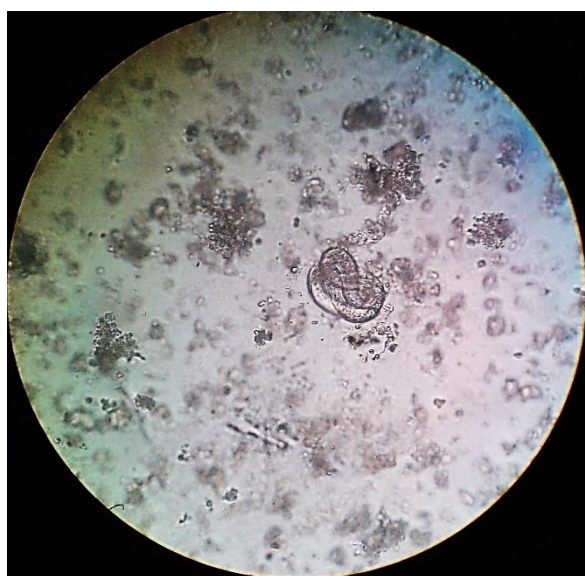


Imagen 13. Fotografía de Larva 3 de *Ancylostoma caninum* recuperada en Lote 6, sometido a tres tratamientos con emulgel de ivermectina 10X (Mendoza ,2016)

En la Tabla 10, se muestran los resultados encontrados en los ratones del lote siete correspondiente a animales inoculados y tratados a los 30, 60, 90 y 120 días, en este grupo no se detectó la presencia de larvas en ninguno de los animales.

Tabla 10. Larvas de *Ancylostoma caninum* recuperadas de los ratones del Lote 7 sometidos a cuatro tratamientos con gel de ivermectina en dosis de 200 µg/ kg, sacrificio a los 120 días después de tratados

Ratón	Número de larvas por órgano							Σ larvas por ratón
	Bazo	Cerebro	Corazón	Hígado	Músculo	Pulmón	Riñón	
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
Σ larvas por órgano	0	0	0	0	0	0	0	0
\bar{x}	0	0	0	0	0	0	0	0

En la Tabla 11 se reportan un total de 33 larvas y un promedio de 3.3, en el Lote 1 (Control Positivo) fue donde se encontraron el mayor número de larvas, 27, mientras que en el Lote 2 (Control Negativo) no se encontraron. En el Lote 3, que sirvió para probar si el gel inhibe la migración larvaria sólo se recuperó 1 larva. En el Lote 4 (1 tratamiento) y 5 (2 tratamientos) sólo se obtuvieron 2 larvas, Lote 6 (3 tratamientos) sólo 1 larva, para el Lote 7 ya no se recuperaron larvas.

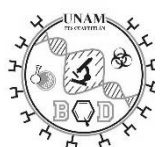


Tabla 11. Total de larvas de *Ancylostoma caninum* recuperadas de todos los de cada uno de los Lotes

Ratón	Lotes							Σ larvas
	1	2	3	4	5	6	7	
	C (+)	C (-)	Migración	1 TX	2 TX	3 TX	4 TX	
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	2	0	0	0	0	0	0	2
3	4	0	0	0	1	0	0	5
4	2	0	0	0	0	0	0	2
5	1	0	0	0	0	0	0	1
6	1	0	1	0	0	0	0	2
7	5	0	0	0	1	0	0	6
8	5	0	0	1	0	0	0	6
9	3	0	0	1	0	0	0	4
10	4	0	0	0	0	1	0	5
Σ larvas por lote	27	0	1	2	2	1	0	33
\bar{x}	2.7	0	0.1	0.2	0.2	0.1	0	
s^2	77.79	0	0.1	0.18	0.18	0.1	0	

A continuación, se calculó el porcentaje de eficacia del emulgel, respecto al conteo larvario, mediante de la Ecuación de Wescott:

$$\% E = \frac{Y-Z}{Y} \times 100$$

Donde:

%E = % Eficacia

Y=Total de larvas encontradas antes del tratamiento

Z=Total de larvas encontradas después del tratamiento

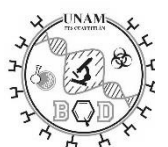
Por lo tanto para el Lote 3:

$$\% E = \frac{27-1}{27} \times 100 = 96.3\% \text{ de eficacia del fármaco}$$

Entonces:

$$\% E = \frac{27-2}{27} \times 100 = 92.6\% \text{ de eficacia del fármaco en el Lote 4}$$

Por lo tanto:



$$\% E = \frac{27-2}{27} \times 100 = 92.6\% \text{ de eficacia del fármaco en el Lote 5}$$

Igualmente:

$$\% E = \frac{27-1}{27} \times 100 = 96.2\% \text{ de eficacia del fármaco en el Lote 6}$$

Finalmente:

$$\% E = \frac{27-0}{27} \times 100 = 100\% \text{ de eficacia del fármaco en el Lote 7}$$

Tales porcentajes de eficacia del fármaco corresponden a un 96.3%, 92.6%, 92.6%, 96.2% y 100% de disminución e inhibición de la migración larvaria (Tabla 12). Por lo que se puede inferir que la presencia de larvas de *Ancylostoma caninum* disminuyó radicalmente con respecto al grupo control, ya que el aumento de la eficiencia del fármaco fue inversamente proporcional al conteo larvario.

En la Tabla 12, se reporta el porcentaje en que redujo el conteo de larvas y el porcentaje de eficiencia del fármaco, en el Lote 3, se inhibió la migración en un 96.3%, mientras que en los Lotes tratados 30 días posteriores a la inoculación aumenta parcialmente el porcentaje de implantación hasta llegar al 100% en el Lote 7.

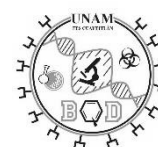
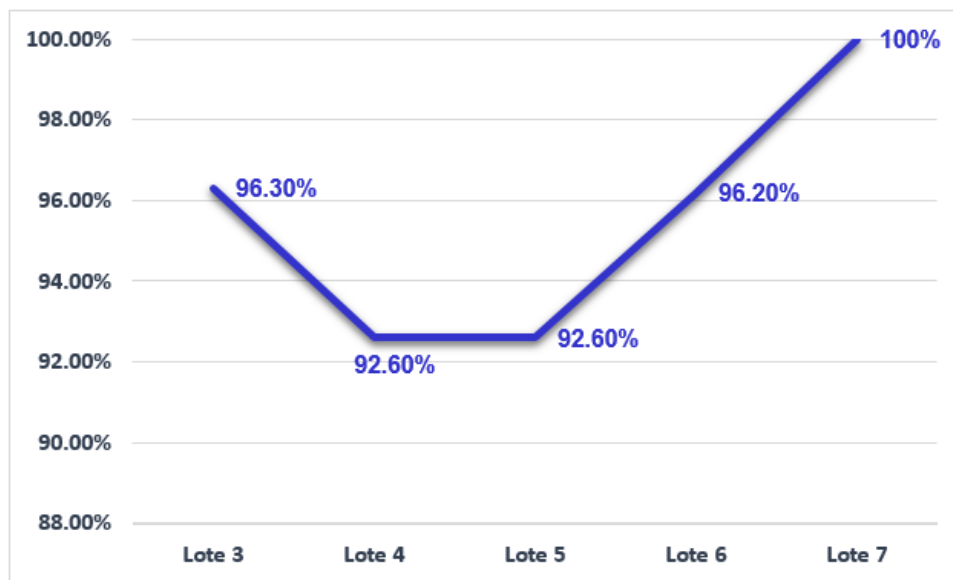


Tabla 12. Porcentaje de reducción de larvas posterior al tratamiento con el emulgel de ivermectina

	Lotes				
	3	4	5	6	7
Conteo inicial	1	2	2	1	0
% de reducción de larvas y /o eficiencia del fármaco	96.3%	92.6%	92.6%	96.2%	100%

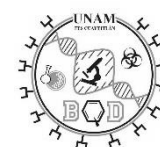
En el Gráfico 1, se observa la tendencia ascendente de la eficacia del fármaco y por consecuencia la reducción de larvas recuperadas entre los Lotes tratados 30 días después de la inducción de la infección, hasta alcanzar el 100% con cuatro aplicaciones del tratamiento con gel de Ivermectina en dosis de 200 µg/kg de peso.

Gráfica 1. Porcentaje de reducción de larvas y eficiencia del fármaco



A continuación se muestra el Análisis de Varianza (ANOVA), por lo tanto se deben de establecer dos hipótesis:

***H₀*:** La aplicación del emulgel de ivermectina no es efectivo en la eliminación de larvas de *Ancylostoma caninum*



H₁: La aplicación del emulgel de ivermectina es efectivo en la eliminación de larvas de *Ancylostoma caninum*

Tabla 13. Análisis de Varianza aplicado a los resultados obtenidos de los diferentes grupos del estudio.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	58.34285714	6	9.723809524	18.508	2.9E-12	2.246407983
Dentro de los grupos	33.1	63	0.525396825			
Total	1675.442857	69				

Partiendo de los resultados anteriores (Tabla 13), podemos decir que si el valor crítico asociado al estadístico F es menor que $\alpha = 0,05$, es decir, $F_c = 18.5 > F_\alpha = 2.25$, por lo tanto se rechaza H_0 y se acepta H_1 , es decir, se concluye que, efectivamente que la aplicación del emulgel de ivermectina se asocia a la disminución de larvas de *Ancylostoma caninum*.

Posteriormente se aplicó la prueba de Tukey (Diferencia de Medias Mínima Significativa Honesta) para comparar la diferencia de medias entre cada grupo; se considerando un $\alpha = 0.05$

Tabla 14. Prueba de Tukey

Estadístico	Valor
HSD Diferencia Honestamente Significativa	0.9719
Multiplicador Q α de Tukey	4.24
MSE Cuadrado del Error Medio	0.5254
N Tamaño de muestra de cada grupo	10

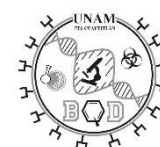


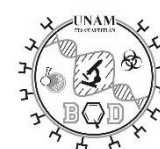
Tabla 15. Prueba de Tukey. Diferencia entre las medias de los Lotes experimentales

Lotes comparados	Diferencia de medias	Significancia
L1- L2	2.7	0.9719 < 2.7
L1-L3	2.6	0.9719 < 2.6
L1-L4	2.5	0.9719 < 2.5
L1-L5	2.5	0.9719 < 2.5
L1-L6	2.6	0.9719 < 2.6
L1-L7	2.7	0.9719 < 2.7
L2-L3	0.1	0.9719 > 0.1
L2-L4	0.2	0.9719 > 0.2
L2-L5	0.2	0.9719 > 0.2
L2-L6	0.1	0.9719 > 0.1
L2-L7	0	0.9719 > 0
L3-L4	0.1	0.9719 > 0.1
L3-L5	0.1	0.9719 > 0.1
L3-L6	0	0.9719 > 0
L3-L7	0.1	0.9719 > 0.1
L4-L5	0	0.9719 > 0
L4-L6	0.1	0.9719 > 0.1
L4-L7	0.2	0.9719 > 0.2
L5-L6	0.1	0.9719 > 0.1
L5-L7	0.2	0.9719 > 0.2
L6-L7	0.1	0.9719 > 0.1

En la Tabla 16 se reportan las diferencias de las medias de cada grupo experimental.

Tabla 16. Tendencia de migración de las larvas de *Ancylostoma caninum* de los órganos revisados en cada lote

Lote	Número de larvas por órgano							Σ larvas por lote
	Bazo	Cerebro	Corazón	Hígado	Músculo	Pulmón	Riñón	
1	3	7	0	7	5	2	3	27
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	1	0	0	0	0	1
4	1	1	0	0	0	0	0	2
5	0	0	0	0	1	1	0	2
6	1	0	0	0	0	0	0	1
7	0	0	0	0	0	0	0	0
Σ larvas por órgano	5	8	1	7	6	3	3	33
\bar{x}	0.71	1.14	0.14	1	0.86	0.43	0.43	4.7



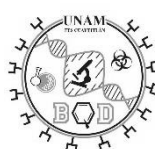
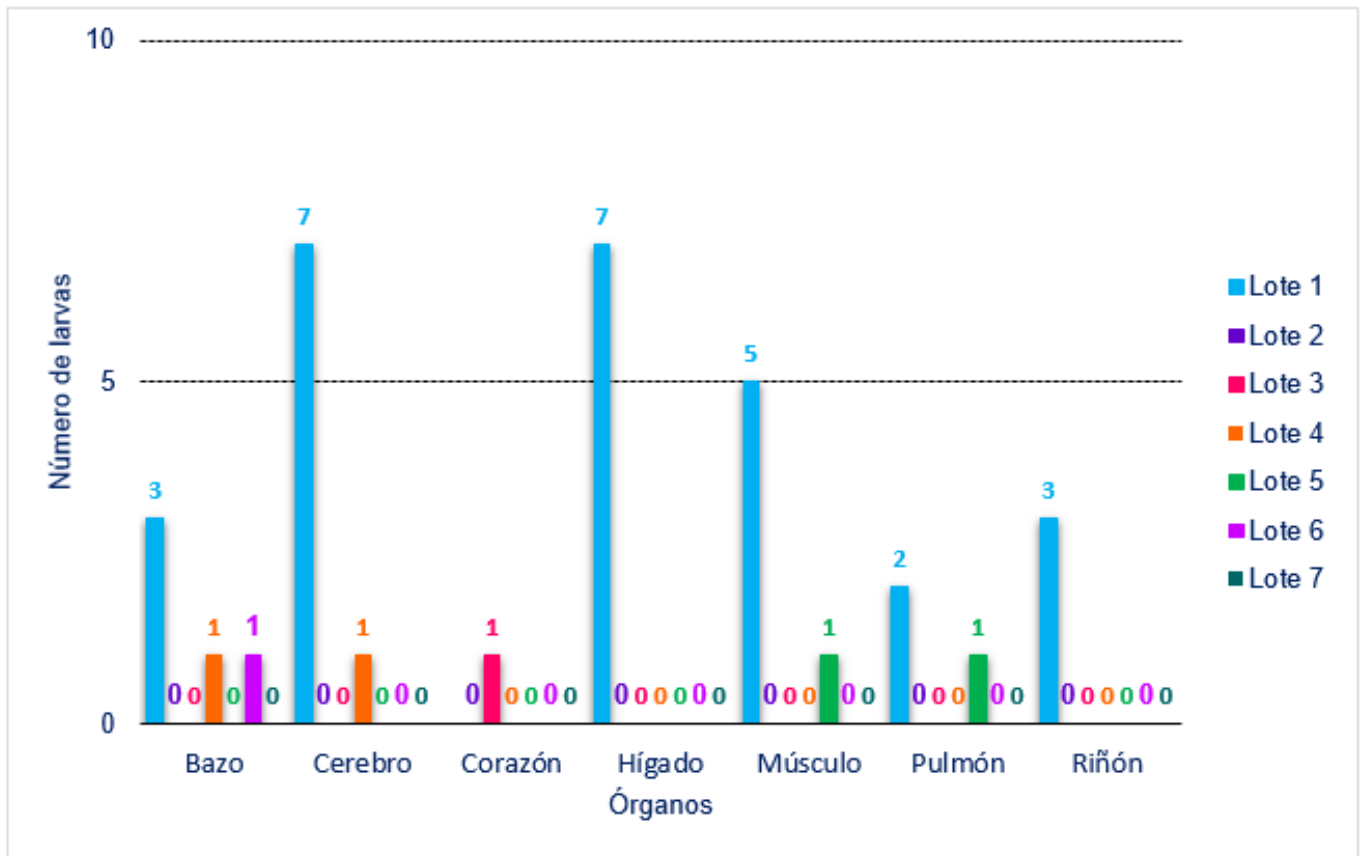
En la Tabla 16 se reportan el número total de larvas encontradas en cada órgano, en resumen, en el Lote 1 se encontraron un total de 27 larvas: 7 larvas en cerebro e hígado, 5 larvas en músculo, 3 larvas en bazo y riñón y 2 larvas en pulmón; en el Lote 2 no se encontraron larvas; en el Lote 3 se recuperó sólo 1 larva en corazón, mientras que en el Lote 4, 2 larvas: en bazo y cerebro. En el Lote 5, igualmente, 2 larvas, en músculo y pulmón; en el Lote 6 sólo se recuperó 1 larva en bazo, mientras que en el Lote 7 no se recuperaron.



Imagen 14. Fotografía de pulmón de ratón de Lote 1. Control Positivo. Se observan zonas semicirculares de coloración rojiza en la superficie del tejido pulmonar características de las lesiones asociadas a la migración de las larvas de *Ancylostoma caninum* en estos órganos, 30 días posteriores a la inoculación (Mendoza ,2016)

En total se recuperaron 33 larvas, se puede decir que el órgano hacia el que hubo mayor desplazamiento de larvas fue el cerebro con 8 larvas, seguido por el hígado con 7 larvas, en seguida el músculo con 6 larvas, el bazo con 5 larvas, pulmón y riñón con 3 larvas; en último lugar el corazón con 1 larva. Reportando los promedios de 1.14, 1, 0.86, 0.71, 0.43, 0.43 y 0.14 respectivamente.

Gráfica 2. Tendencia de migración por los diferentes órganos de los ratones infectados con *Ancylostoma caninum*



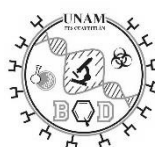
8. Discusión

En este estudio se evaluó la actividad de una formulación de ivermectina en forma de emulgel sobre larvas enquistadas de *Ancylostoma caninum* empleando como modelo de laboratorio a ratones de la cepa CD-1.

El primer aspecto que debió cubrirse fue la obtención de las 35,000 larvas de *Ancylostoma caninum* requeridas para la inoculación de los animales, se establecieron una serie de estrategias con muchas variables para lograr el desarrollo de estas, aspecto que llevó a invertir un lapso de 4 meses debido a que, por un lado no existen disponibles artículos en los que se hayan desarrollado infecciones inducidas en animales de laboratorio y aun cuando la evolución de las larvas parece un evento simple en la naturaleza, que permite con mucha facilidad su evolución en el ambiente, las condiciones del laboratorio no resultaron viables, aun cuando se proporcionaron las condiciones de humedad abundante (empleando agua de diversos orígenes) con un ambiente francamente líquido, la condición de temperatura homogénea y constante, ya que se probaron diferentes temperaturas, (observando que ligeras variaciones afectaban intensamente las poblaciones larvarias, paralizándolas e incluso matándolas).

Se les suplementó con una dotación de enterobacterias que en un primer momento procedieron de cepas obtenidas por aislamiento en el laboratorio de parasitología cultivadas en agar Mc Conkey obtenidas de heces de ratón, pero que más adelante se determinó que el contenido bacteriano suspendido en agua de dos bolos fecales de estos animales eran suficientes para cubrir las necesidades que permiten el desarrollo de las larvas en caja Petri, aun así el nivel de desarrollo y rendimiento de los cultivos fue muy pobre y solo a muy largo plazo se alcanzó la meta de acumular los 35,000 estadios larvarios que se requerían.

Una variable que aparentemente resultó clave en este sentido y que en los microclimas del suelo se presenta continuamente, es la disponibilidad de oxígeno, que en los cultivos queda limitado por ser un ambiente cerrado (caja Petri) que, mientras no se destapen los recipientes puede debilitar incluso causar la muerte de las larvas o afectar su viabilidad dentro de los hospederos a los que se incorpora. Adicionando esto, debe tenerse en cuenta que las enterobacterias que se incorporan interactúan con el ambiente y los diversos sustratos disponibles, produciendo metabolitos como el metano o el dióxido de carbono que les resultan tóxicos, por lo que una vez liberados en el ambiente pueden ocasionar la muerte por lo que si los cultivos periódicamente se exponen al aire se prolonga la supervivencia de las larvas. Otros elementos altamente nocivos que se detectaron incluyeron cajas contaminadas con detergente, hongos y la presencia de cloro aun en cantidades reducidas.



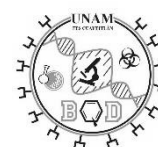
Las 35000 Larvas 3 de *Ancylostoma caninum* empleadas para la inoculación fueron distribuidas en dosis de 500 por ratón y de acuerdo a la concentración detectada en el recipiente de cultivo hubo que suministrarse un volumen de 0.6 mililitros de suspensión a cada uno de los animales, por lo que la inoculación debió realizarse por etapas hasta alcanzar el volumen requerido. Del total de 35,000 larvas 3 inoculadas, se logró recuperar solo 27 larvas en total correspondientes a una tasa de recuperación de 0.08%. Martín y Posadas. (2010), indican resultados similares en su experimentación empleando la misma vía de inoculación y obteniendo una tasa de recuperación baja de 1.28% ²³ Igualmente en el laboratorio de parasitología, Ramírez (2014), se han realizado investigaciones con otros nemátodos como *Toxocara canis*, encontrando una gran resistencia en su estructura y en consecuencia altas tasas de recuperación.

No existe información específica sobre las estrategias para inducir la infección y sobre el comportamiento que siguen las larvas de *Ancylostoma caninum* en los hospederos paraténicos.

Entre los factores que pudieron afectar la tasa de recuperación de larvas se puede considerar aspectos como el nivel de viabilidad de la fase inoculada, pues como se observó en la obtención de cultivos, las larvas son sensibles a cambios mínimos en el ambiente, como la temperatura, por lo que al retirar las larvas de la estufa bacteriológica en la que se encontraban y exponerlas a un cambio brusco es factible que ese cambio afectara la supervivencia.

Este tipo de fases infectantes en la mayor parte de las veces ingresa a sus hospederos por vía transcutánea y en este estudio fueron inoculadas por vía oral, aspecto que pudo afectar la migración, su desarrollo en el hospedero en un ambiente agresivo al que fueron expuestas en este caso, enfrentándolas a un pH de entre 1.5 a 3.5 por lo que los organismos fueron expuestos a la dificultad de atravesar el intestino y el rol del sistema inmunológico puede desencadenar mecanismos que afecten la supervivencia y la integridad de la larva ocasionando su muerte o expulsión.

Se considera que lo anterior disminuyó la carga parasitaria que migró a través del hospedero, sin embargo, se cree que la infección fue exitosa partiendo de la evidencia de la implantación con la imagen 14, donde se identifica a los pulmones de uno de los animales alrededor de 30 lesiones causadas por una cantidad equivalente de larvas en sólo ese animal, cantidad mayor a la cuantificada al microscopio en los 6 lotes inoculados. De acuerdo con esto entonces la digestión enzimática pudo afectar la estructura de las larvas y degradarlas parcial o totalmente afectando su forma y reduciendo la posibilidad de identificar su presencia en los tejidos en la muestra.



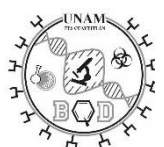
Considerando esta posibilidad, al finalizar el experimento se reprodujeron las condiciones de la digestión, colocando larvas en jugo gástrico durante el mismo tiempo manejado en la metodología de este trabajo; observando al microscopio la pérdida de estructuras morfológicas así como la semi desintegración al final del procedimiento.

Otra hipótesis planteada es que al mantener las gasas al terminar la digestión con restos de tejido en descomposición se pudo generar una contaminación que degradara los restos larvarios, dificultando la identificación al microscopio, Martín y Posadas (2010), detectaron una condición similar, considerando a las larvas con un nivel alto de sensibilidad al manejo, desde el cultivo hasta la digestión, concluyendo que este procedimiento puede desestabilizar y causar daño a los organismos, modificar su estructura y reducir la posibilidad de detectarlas al microscopio ²³.

Se sugiere que para próximas investigaciones se realice inoculación transcutánea así como pruebas que muestren el tipo de reacción generada en el hospedero a nivel inmunológico para descartar o confirmar el efecto de la respuesta inmune sobre el parásito. Además de estandarizar la técnica de digestión o bien buscar alternativas para que la recuperación de las larvas sea más eficiente y mantengan su estructura para poder ser identificadas.

Vardhani y Johri (1981) inocularon a ratones albinos suizos hembras e isogénicos con un promedio de 1000 larvas y recuperaron la mayor cantidad por necropsia 21 días después de la infección con tasa de recuperación de 36.5%. El método de recuperación en cada tejido consistió en la técnica desarrollada por Soh (1958) consistente en una digestión de los tejidos con jugo gástrico formulado con 0.5% Pepsina y 0.7% de HCl diluidos en solución salina fisiológica isotónica durante 4 horas a 37°C, posteriormente las larvas se recuperaron por el método de Baermann, con un 94.6% de recuperación en el grupo control ⁴⁷. En ésta experimentación se comenzó con las necropsias 30 días después de la inoculación, con composición diferente de jugo gástrico (0.6% pepsina y 0.6 % HCl y agua destilada) durante 48 horas a 37°C, recuperando el pellet con las larvas por centrifugación a 3500 rpm y resuspendiendo en formol al 10%. Por lo tanto, se sometió a las larvas a una digestión más prolongada en condiciones de acidez, posible contaminación y acumulación de gases por la degradación de tejidos, además de la separación por centrifugación donde probablemente se perdieron componentes estructurales.

Abordando los hallazgos de larvas en diferentes sitios, la distribución observada en el Lote 1 que era el Control Positivo, podemos establecer un patrón de migración larvaria, con base en el hallazgo de larvas en los siguientes órganos: cerebro, hígado y músculo respectivamente. El cerebro se considera como un sitio inmunoprivilegiado, por la presencia de la barrera hematoencefálica (BHE),

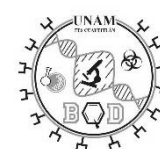


células microgliales, ausencia de sistema linfático, baja expresión de moléculas presentadoras de antígenos y citocinas inmunosupresoras, las cuales son secretadas por astrocitos que recubren y contactan con la BHE, a esto se le atribuye la mayor migración larvaria hacia este órgano. En cuanto al hígado y músculo, son órganos que debido a su alta irrigación brindan el microambiente óptimo para la permanencia de las larvas ²³. En experimentos anteriores se han encontrado tendencias de migración similares, tal como lo describen Martín y Posadas. (2010). El número de larvas recuperadas en la totalidad de los tejidos resulta muy reducido y la distribución en los tejidos no resulta lógico si se analiza la mecánica migratoria que se ha descrito en la literatura por lo que las zonas anatómicas con la mayor más afectadas deberían ser el tejido muscular esquelético y el cerebral. Este aspecto puede quedar con un mayor respaldo porque durante la realización de las disecciones de los animales se observaron lesiones hemorrágicas, especialmente en el parénquima de los pulmones que se producen debido a la migración de las larvas por estos tejidos cuyo número solo en la pieza documentada mediante fotografía sugiere en un solo pulmón la presencia de seis larvas (ver imagen 14).

Al comparar el número de larvas recuperadas en el grupo de ratones del Lote 3 (con 1 tratamiento el día de la inoculación y sacrificio 30 días posteriores) para medir la inhibición de la migración con respecto al Control Positivo (Lote 1), se obtuvo un porcentaje de reducción de larvas del 96.3%, equivalente al mismo porcentaje de eficiencia del fármaco.

El porcentaje de reducción de larvas y/o eficiencia del fármaco para el grupo de animales con 1 tratamiento 30 días posteriores a la inoculación (Lote 4) y para el grupo con 2 tratamientos (Lote 5) con respecto al Control Positivo (Lote 1) fue de 92.6%, siguiendo la tendencia referida en bazo, cerebro, músculo y pulmón se infiere que el porcentaje de eficiencia del fármaco, al reducir el número de larvas encontradas es mayor en el Lote 3 que en el Lote 4 y 5, porque el emulgel fue aplicado al siguiente día de la infección inducida, por lo que la actividad antiparasitaria se suma a la posible pérdida de larvas, secundaria al procedimiento de inoculación.

Para el grupo con 3 tratamientos y sacrificio a los 90 días (Lote 6) el porcentaje de reducción de larvas y/o eficiencia del fármaco aumentó a 96.2% y finalmente para el grupo con 4 tratamientos y sacrificio a los 120 días (Lote 7) aumentó al 100%. Si comparamos únicamente los lotes en los que se administró el tratamiento 30 días posteriores a la inoculación, se observa un comportamiento ascendente en el porcentaje de eficiencia del fármaco, es decir, a mayor número de aplicaciones del emulgel, aumenta su efectividad, por lo tanto encontraremos menos parásitos en el hospedero. Basado en el porcentaje de reducción de larvas, obtenido experimentalmente, se cree que con 4 aplicaciones del emulgel puede lograr la



eliminación total del agente infeccioso, en este caso *Ancylostoma caninum*, definida como eficiencia del fármaco.

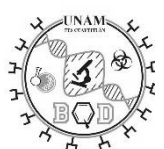
El análisis estadístico de los resultados obtenidos mostró que, por un lado conforme el tratamiento se aplica en una fase más temprana de la infección se obtienen mejores resultados, además de que un mayor número de aplicaciones asegura la eliminación de las larvas. De modo que, después de realizar el análisis de varianza se obtuvo una F calculada de $18.5 > F_{\alpha} = 2.25$, por lo tanto se rechaza H_0 y se acepta H_1 , es decir, hay una relación proporcional entre la aplicación del emulgel de Ivermectina, el número de dosis suministradas y la disminución en el conteo de larvas de *Ancylostoma caninum*.

La Prueba de Tukey que es complementaria y permite establecer una comparación honesta de entre las medias de los Lotes de experimentación y el Control Positivo, permitió detectar una diferencia estadísticamente significativa.

Existen experimentos previos donde se encontraron tendencias similares a las obtenidas en este estudio, Vardhani y Johri (1981) , reportaron que las larvas comienzan a migrar hacia los pulmones y músculos de la cabeza, cuello y tórax a partir del primer día post inoculación, recuperando la mayor cantidad de larvas por necropsia 21 días después de la infección en ratones albinos suizos hembras e isogénicos .⁴⁷

Vardhani y Johri (1981) sugieren que el número de larvas expelidas o destruidas por inmunización pasiva del hospedero se encontró a los 21 días después de la infección. Se ha reportado que el sistema inmune del hospedero tiende a expeler los gusanos así como a cambiar sus patrones de supervivencia. Lo que explica la rápida expulsión o migración de las larvas del tracto gastrointestinal Vardhani y Johri (1981) encontraron que los gusanos eran expulsados cuando las células cebadas infiltran la mucosa, la rápida expulsión sugiere que sustancias secretadas por el sistema inmune en sus mecanismos de defensa probablemente cambien el carácter migratorio y patrones de supervivencia de las larvas. Vardhani y Johri (1981), sustentan sus afirmaciones mediante los cambios histológicos observados en la mucosa al ser infiltrada por las células cebadas estudiado previamente por los mismos investigadores. Vardhani y Johri (1981) concluyen que en hospederos inmunizados, la larva no es capaz de sobrevivir a los mecanismos de las respuestas mediadas por células, a pesar de que los músculos son sitios favorables para la retención y supervivencia⁴⁷ por esta razón se sugiere que en futuros experimentos se realicen pruebas inmunológicas e histológicas para abordar este aspecto que no fue evaluado.

Factores fisiológicos como el incremento de la acidez en el intestino, exudados inflamatorios y la acción protectora de anticuerpos antiparasitarios dentro del



sistema inmune del hospedero pueden hacer insostenible la sobrevivencia y permanencia de los gusanos:

En contraste, los ratones empleados en el experimento no estaban inmunizados, información actualizada generada por Loukas, *et al* (2004) sugiere que el desafío antigénico se produce en numerosos sitios incluyendo la piel, los pulmones y la mucosa intestinal para el sistema inmune de los vertebrados. Además los nematodos secretan inmunomoduladores, que sesgan o amortiguan la respuesta inmune para lograr su supervivencia a largo plazo.

En hospederos definitivos la respuesta inmune, tanto humoral como celular es Th2 donde se producen elevados niveles de IgE, así como eosinofilia sistémica y localizada, tanto en pulmones como en los sitios de adhesión en el intestino, también intervienen IL-4 e IL-5.

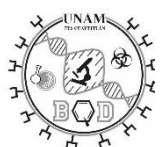
Ancylostoma, excreta y secreta una gran cantidad de productos antigénicos de excreción–secreción con un papel de inmunomodulación, inmunoevasión y supresión de la proliferación celular e inmunosupresión, son productos proteicos, como proteasas, inhibidores de proteasas, lectinas tipo C, antioxidantes y moléculas antiinflamatorias asociadas a la infección crónica que permiten la supervivencia por largo tiempo de los estadios larvarios. Sin embargo, sólo en hospederos jóvenes se han encontrado IgG anti moléculas de secreción-excreción de estos nematodos ²², por lo que no se debe descartar a la respuesta inmune del hospedero como un factor más para la disminución de la tasa de implantación de *Ancylostoma caninum* en los ratones jóvenes empleados.

De las 33 larvas recuperadas, el órgano que presentó mayor migración larvaria fue el cerebro con 8 (lo cual corresponde con la información disponible en cuanto a migración), seguido por el hígado con 7, músculo con 6 larvas, bazo con 5 larvas, pulmón y riñón con 3; en último lugar el corazón con 1 larva.

Aparentemente un pequeño número de larvas fue retenido en el hígado sin migrar al corazón o pulmón, probablemente el hígado actuó como barrera inmunológica previniendo la migración hacia los pulmones y riñones o bien cuando las larvas no podían instalarse en zonas definidas este órgano pudo ser usado para reiniciar el ciclo migratorio y por esta razón se detectó su presencia ⁴⁷

La ruta migratoria depende en gran medida de diversos factores como la edad, el estado inmunológico y de la dosis infectiva ingerida. El aspecto genético de los ratones también tiene un papel importante, pues de las diferentes cepas de ratones se han mostrado varios rangos de susceptibilidad, ya que pueden ser ampliamente resistentes o retener en altas cantidades a las larvas en tejidos somáticos según su genotipo.

Diversos estudios han tenido el propósito de investigar la distribución de larvas según las diferentes cepas de ratones. Hay numerosas diferencias entre cepas de ratones endogámicos y exogámicos. Distribuyéndose a través de todo el cuerpo de acuerdo a la afinidad dependiente de cada especie de roedor infectado con



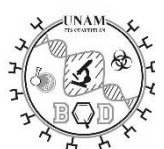
Toxocara canis, respecto a *Ancylostoma caninum* no se cuenta con mucha información bibliográfica⁴³

Con la misma formulación probada en este trabajo, Pérez (2015) desarrolló una prueba crítica usando el emulgel en concentración al 0.5% contra fases adultas de *Toxocara canis* y *Ancylostoma caninum*, con dos dosis epicutáneas de 2 g en perros infestados de forma natural; con un promedio de eliminación de 1906.83 huevos / gramo de heces, logrando una reducción de huevos del 100% al octavo día pos tratamiento. ³³

Se considera a la ivermectina como un fármaco muy útil y efectivo como opción terapéutica, sin embargo, se puede generar muy gradualmente resistencia al principio activo por el incorrecto uso de la formulación, si el tratamiento no es estricto no se eliminará al 100% de los parásitos, la progenie de parásitos tratados en fase larvaria producirá adultos resistentes ya sea en fase adulta o larvaria y al cabo de unas semanas cuando se reproduzcan van a generar una descendencia con genotipos resistentes a la ivermectina que van a corresponder cada vez más frecuentemente a genotipos resistentes.

Lo novedoso de la forma farmacéutica del emulgel con esta u otras moléculas abre una nueva ruta terapéutica efectiva, accesible, no invasiva y segura que podría ser utilizada en animales y en un futuro humanos.

La composición química del emulgel consta de una fase acuosa compuesta por agua y un agente con propiedades bioadhesivas, en este caso el carbómero que induce una estancia prolongada del producto sobre la piel. Este efecto es conocido como bioadhesión y se origina al contacto y penetración del carbómero con el tejido receptor en presencia de agua, relajando las cadenas poliméricas y formando enlaces químicos débiles e interacciones fisicoquímicas ³⁵. La liberación controlada del principio activo a partir del emulgel ocurre ya que es un sistema bifásico (aceite/agua), es decir, la liberación de la ivermectina es dependiente de su difusión a través de los triglicéridos de cadena media presentes en el producto, alternativa útil para el tratamiento antiparasitario de pequeñas y grandes especies de animales, debido a su fácil aplicación y no requiere de personal especializado para la misma ³⁵. También dentro de la formulación está incluida la glicerina la cual tiene propiedades promotoras para la permeación, incrementando esta característica sobre la ivermectina en la piel que es una barrera física natural que por su estructura opone resistencia al paso de compuestos exógenos, de esta manera la formulación contiene sustancias que incrementan la partición y difusión de moléculas lipofílicas presentes en la piel. La fase acuosa se encuentra dispersa en la fase oleosa compuesta por los triglicéridos de cadena media, es decir, grasas de origen vegetal obtenidas del aceite de coco y palma que poseen una gran compatibilidad con la piel del roedor, teniendo tolerancia cutánea, además de ser solventes para la ivermectina. En el vehículo están presentes los polímeros POE (poli óxido de etileno), POP (poli óxido de fenileno) y POE (poli óxido de



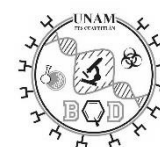
etileno) que funcionan como agentes surfactantes o tensoactivos, que se adsorben en la interfase aceite-agua, de esta forma disminuye la tensión superficial permitiendo que la interfase se expanda, formando finas gotas dispersas que adsorben una mayor cantidad del polímero hasta que su volumen de concentración disminuye. Las moléculas del agente tensoactivo forman un enlace entre la fase polar (agua) y la fase no polar u oleosa (triglicéridos) e incorporan y liberan ivermectina de manera controlada ³⁵. Finalmente un agente neutralizante como la trietanolamina neutraliza el pH para facilitar la adhesión del emulgel, además de aumentar la viscosidad del sistema al hacer que los grupos carboxilo del carbómero se desprotonen dando transparencia al gel. ³⁵

Todos estos factores presentes en esta formulación permitieron el contacto de los ingredientes activos con la piel del ratón sin bloquearla, su formulación como emulsión aceite-agua fue un vehículo efectivo para optimizar la distribución de la ivermectina en la piel y su posterior penetración. Esta formulación está incluida en el grupo de los fármacos *pour on* (de aplicación cutánea) que aplicada sobre la línea media dorsal de los animales en experimentación, al mezclarse con las secreciones de las glándulas sudoríparas y sebáceas potencian el efecto de emulsión que mejora su actividad como vehículo facilitando la distribución dérmica de la ivermectina. Esto además puede asociarse al hecho de que algunos animales secretan un sebo aceitoso que se emulsifica con el sudor, llenando el poro del folículo, la piel y debajo del pelaje; fenómeno que ocurre sobre todo el cuerpo y genera un efecto sistémico desde el sitio de aplicación lo cual favorece la distribución por todo el cuerpo alcanzando la ubicación del parásito sobre el cuerpo y en los diferentes tejidos que alojó.

Debe considerarse una dualidad de factores que influyen en la actividad biológica del emulgel, aquellos que son propios de los ratones CD 1 que se sometieron a tratamiento, tales como peso, sexo, edad, genética, nutrición, hábitos de vida, emocionales y patologías asociadas y por otro lado los factores propios del fármaco que incluyen las propiedades fisicoquímicas y factores constitucionales y conformacionales ²¹.

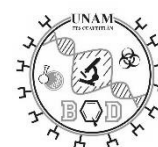
La farmacocinética y actividad de las avermectinas entre ellas la ivermectina son influenciadas por las propiedades fisicoquímicas de las moléculas activas, el vehículo empleado influye en la velocidad y duración del proceso de absorción del fármaco y puede modificar el perfil de concentración plasmática.

La vía de administración de los antihelmínticos afecta su distribución, la biodisponibilidad y persistencia de sus concentraciones en el organismo. La ivermectina es un fármaco altamente lipofílico que en este estudio se suministró por vía epicutánea que se absorbió y distribuyó adecuadamente después de su aplicación, posteriormente fue absorbida y concentrada en el tejido adiposo liberándose lentamente, estos son factores que favorecieron el porcentaje de eficiencia del emulgel con un valor de 92.6% hasta llegar al máximo de 100% al transcurso de las semanas (ver resultados)³⁵.



Derivado de la vía de administración hubo mayor biodisponibilidad, debido a que se une a las proteínas plasmáticas como la albumina se distribuyó por todo el cuerpo de los animales en la mayoría de los tejidos particularmente la grasa corporal con un período residual de 10 a 12 semanas, la literatura reporta que no penetra con facilidad en el líquido cefalorraquídeo con lo que se minimiza su toxicidad²⁴, factor adicional para que el cerebro fuese el lugar en el que se encontraron el mayor número de larvas.

El producto probado cumple con aspectos que facilitan la absorción del principio activo como tener una concentración alta, ser liposoluble, tener un coeficiente de partición elevado, y no ionizado; además la cantidad de fármaco absorbida fue alta considerando que la superficie de absorción y la vascularización de la piel es elevada. Al ser un sistema bifásico (aceite/agua), su mecanismo de transporte a través de las membranas del organismo es mediante difusión simple a una velocidad proporcional al gradiente de concentración ²¹. Otra de las ventajas del emulgel es la posibilidad de incrementar el tiempo de permanencia *in-situ*, reduciendo el número de aplicaciones, a partir de ahí, la ivermectina es liberada aumentando su biodisponibilidad ³⁵

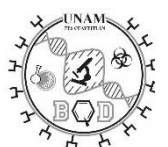


9. Conclusiones

Se evaluó la actividad antiparasitaria de una nueva formulación de ivermectina en emulgel aplicada contra larvas enquistadas de *Ancylostoma caninum* que regularmente infecta a los caninos, con implicaciones zoonóticas, estableciendo de esta manera nuevas opciones para su tratamiento.

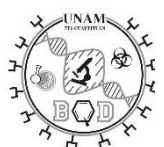
Se determinó un nivel de inhibición de la migración de 96.3%, en los lotes tratados 30 días posteriores a la inoculación (Lote 3), una eficacia de 92.6% para el Lote 4 y 5, con una y dos aplicaciones del emulgel, respectivamente; para el Lote 6 con tres aplicaciones 96.2% y para el Lote 7 con cuatro tratamientos se encontró una eficiencia del 100%.

Asimismo se identificó a la digestión enzimática como la fase crítica del experimento y los factores influyentes en la implantación y recuperación de larvas, tales como genéticos, ambientales e inmunológicos.



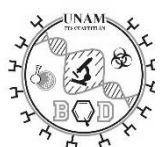
10. Bibliografía

1. Alfaro, M. Prevalencia de *Ancylostoma caninum* en *Canis lupus familiaris* en el área urbana y periurbana de la colonia Zacamil del municipio de mejicanos, San Salvador. [tesis];El Salvador: Universidad de El Salvador;2011.
2. Araujo, J.M., Araújo, J.V., Avelar, T., Braga, F., Freitas, F., Freitas, L.;2014. Biological Control of Infective Larvae of *Ancylostoma ssp* in bitch sand. Rev. Iberoam.Micol. 31(2): 114-118.
3. Ashton, F., Bhopale, V., Boston, R., Kupprion, E., Schad, G.; 2001.*Ancylostoma caninum*: The finger cell neurons mediate thermotactic behavior by infective larvae of dog Hookworm.Exp.Parasitol.97: 70-76.
4. Bourée, P; 2014. Infecciones parasitarias del intestino. EMC Tratado de Medicina. 18 (3): 1-8.
5. Botero, D, Restrepo, M. Parasitosis humanas. Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas; 1998.
6. Campbell, S., Clements, A., Gray, D., Mc Carthy, J., Soares, R.; 2016.A Critical Apraisal of Control Estrategies for Soil-Transmitted Helminths. Trends in Parasitol. 32 (2):97-107.
7. Centro para el Control y Prevención de Enfermedades. [página principal en Internet]. Atlanta: CDC; c 2015; [actualizado 17 de marzo de 2015; citado 08 de noviembre de 2015];[aprox. 3 pantallas]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/parasites/zoonotichookworm/biology.html>
8. Clasificación y distribución de los climas en México [Internet]:Conevyt; s.f. [consulta el 06 de mayo de 2016]. Disponible a: http://www.conevyt.org.mx/cursos/cursos/cnaturales_v2/interface/main/recursos/antologia/cnant_4_13.htm
9. Cordero del Campillo, M., Rojo, F., Martínez, A., Sánchez, M., Hernández, S., Navarrete, I., Quiroz R. ; Parasitología Veterinaria. México: ed. McGraw-Hill Interamericana; 1999.
10. Cringoli, G., Maurelli, M., Margoglione, M., Musella, V., Rinaldi, L., Utzinger, J.; 2011. *Ancylostoma caninum*: Calibration and comparison of diagnostic

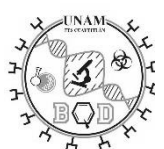


accuracy of flotation in tube, Mc Master and FLOTAC in faecal samples of dogs. *Exp. Parasitol.* 128:32-37.

11. Díaz, M., Espuny, A., Escudero, E., Cárceles, C.; 1997-1998. Farmacología de los endectocidas. *Aplic. Terap. Anales de Vet de Murcia.* 13-14: 3-22.
12. Don, T., Jones, M., Smyth, D., O'Donogue, P., Hotez, P., Loukas, A.; 2004. A pore-forming haemolysin from the hookworm, *Ancylostoma caninum*. *Int. J. for Parasitol.* 34:1029-1035.
13. Feldmeier, H., Heunkelbach, J.; 2008. Epidemiological and clinical characteristics of Hookworm – related cutaneous larva migrans. *Lancet Infect. Dis.* 8:302-309
14. Gan, W., Deng, L., Yang, C., He, Q., Hu, J., Yin, H, *et al*; 2009. An anticoagulant peptide from the human hookworm, *Ancylostoma duodenale* that inhibits coagulation factors Xa and XIa. *FEBS letters.* 583, 1976-1980.
15. García, L., Lamothe, M., Osorio, D.; 2014. Biodiversidad de Nematoda parásitos de vertebrados en México. *Rev. Mex. De Biodiversidad.* 85:171-176.
16. Harrison, L., Córdova, J., Capello, M.; 2001. *Ancylostoma caninum* anticoagulant peptide-5: immunolocalization and *in vitro* neutralization of a major hookworm anti-thrombotic. *Molec. & Biochem. Parasitol.* 115, 101-107.
17. Helminthiasis Transmitidas por el Suelo [Internet]: Global Atlas of Helminth Infections. London School of Hygiene and Tropical Medicine; 2016 [consulta el 18 de junio de 2016]. Disponible a: <http://www.thiswormyworld.org/es/maps/by-worm/helminthiasis-trasmitidas-por-el-suelo>
18. Hotez, P., Zhan, B., Bethony, J., Loukas, A., Williamson, A., Goud, G., *et al*; 2003. Progress in the development of a recombinant vaccine for human hookworm disease: The Hum. Hookw. Vacc. *Initiat.* 33, 1245-1258.
19. Kassai, T. *Veterinary Helminthology.* Londres: ed. Butterworth-Heinemann; 1999.
20. Levine, N. *Tratado de Parasitología.* España: ed. Acribia: 1978.
21. Litter, M. *Farmacología: Experimental y Clínica.* Buenos Aires, México: 1986.

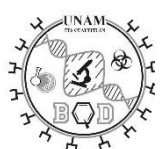


22. Loukas, A., Constant, S., Bethony, J.;2004. Immunobiology of hookworm infection. *FEMS Immunolog. and Medical Microbiolog.* . 43 (2005) 115–124
23. Martín, A., Posadas, M., Comportamiento migratorio de larvas tres de *Ancylostoma caninum* en ratones blancos cepa CD1 con infección inducida. [tesis]. Cuautitlán Izcalli, Estado de México: UNAM; 2010.
24. Medicamentos PLM México [Internet]. México: Medicamentos PLM; 2014 [consulta el 01 de abril de 2015]. Disponible a: http://www.medicamentosplm.com/home/productos/ivexterm_tabletas/187/101/8194/210
25. Navarro, S., Ferreiro, I., Loukas, A.; 2013. The hookworm pharmacophoeia for inflammatory diseases. *Internat. Journ. for Parasitol.* 43,225-231.
26. Nithiuthai, S., Anantaphruti, M., Waikagul, J., Gajadhar, A. ; 2004. Waterborne zoonotic helminthiases: *Vet. Parasitol.* 126, 167-193.
27. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
28. Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental, Salud ambiental, Residuos peligrosos biológico infecciosos, clasificación y especificaciones de manejo.
29. Olazabal, I., Gil, L., Arias, J.; 2014. El Sistema Inmune y su función en el Sistema Nervioso Central. *Rev. de la Fac. de Ciencias de la Salud.* 9, 1-21.
30. Omura, S.; 2010. Ivermectin: 25 years and still going Sorong. *Int. J. of Antimic. Ag.* 31, 91-98.
31. Organización Mundial de la Salud. ¿Por qué se les dice “desatendidas” a algunas enfermedades tropicales? [Internet]: Organización Mundial de la Salud; 2016. [consulta el 06 de mayo de 2016]. Disponible a: <http://www.who.int/features/qa/58/es/>
32. Periago, M. and Bethony, J.; 2012. Hookworm virulence factors: making the most of the host. *Microb. and infect.* 14, 1451-1464.
33. Pérez, G., Prueba crítica a una formulación de Ivermectina en emulgel aplicada epicutáneamente contra formas adultas de *Toxocara canis* y



Ancylostoma caninum en perros con infestación natural. [tesis]. Cuautitlán Izcalli, Estado de México: UNAM; 2015

34. Pumarola, A., Rodríguez T. Microbiol. y Parasitolog. Médica, 881 p. s.f.
35. Quintanar, D., Martínez, J., Mendoza, S., Vidal, G., Trenado, V., inventors; Quintanar, D., assignee. Composición farmacéutica en emulgel de ivermectina para uso veterinario como sistema promotor y bioadhesivo en el tratamiento antiparasitario, y método para obtener la misma. México. W02160248SSA1. 2016 Feb 18.
36. Quiroz, R. Parasitología y Enfermedades Parasitarias de Animales Domésticos. México: ed. Limusa; 1986.
37. Ramírez, A., Inhibición migratoria y actividad sobre larvas enquistadas de *Toxocara canis* de un producto formulado a base de Ivermectina de liberación controlada en ratones de la cepa CD-1 con infección inducida. [tesis]. Cuautitlán Izcalli, Estado de México: UNAM; 2014
38. Ramírez, R., Barboza, G., Muñoz, J., Angulo, F., Hernández, E.; 2004. Prevalence of intestinal parasites in dogs under veterinary care in Maracaibo Venezuela. Vet. Parasitol. 121, 11-20.
39. Sáez, V., Hernández, E., López, L.; 2003. Liberación controlada de fármacos. Aplicaciones biomédicas. Rev. Iberoam. de Polím. 4(2), 111-122.
40. Sahagún P.; 2010. Seguridad de la Ivermectina: toxicidad y reacciones adversas en diversas especies de mamíferos. Rev. MVZ Córdoba 15: 2129-2137.
41. Soulsby, E. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Editorial Interamericana; 1986.
42. Strube, C., Heuer, L., Janecek, E.; 2013. *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. Vet. Parasitol. 193:375-389.
43. Spellman, G. and Nossel, A.; 1971. Anticoagulant activity of dog hookworm. Am. J. Physiol. 220: 922-927.



44. Thompson, R.; 2015. Neglected Zoonotic Helminths: *Hymenolepis nana*, *Echinococcus canadensis* and *Ancylostoma ceylanicum*. Clin. Microb. And Infect. 21: 426-432.
45. Universidad James Cook, Centro de Bioseguridad y Enfermedades Tropicales e Infecciosas. [página principal en internet]. Australia: Universidad James Cook; c 1995-2015; [actualizado 2015; citado 08 de noviembre de 2015]; [aprox. 2 pantallas]. Disponible en: <https://research.jcu.edu.au/btid/resources/images/mouthparts.jpg/view>
46. Uribarren, T., Material de Apoyo para Docencia, Departamento de Microbiología y Parasitología FACMED UNAM [página principal en internet]. México: UNAM; c 2011; [actualizado 20 de mayo de 2015; citado 08 de noviembre de 2015]; [aprox 10 pantallas]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/larva-migrans-cutanea.html>.
47. Vardhani, V., Johri, G.; 1980. The migratory behavior and survival pattern of *Ancylostoma caninum* larvae in an adoptively immunised host. Int. Jour. for Parasitol. 1981:145-147.
48. Xiao, S., Zhan, B., Xue, J., Goud, G., Loukas, A., Liu, Y., *et al* ; 2008. The evaluation of recombinant hookworm antigens as vaccines in hamsters (*Mesocricetus auratus*) challenged with human hookworm, *Necator americanus*. Exp. Parasitol. 118: 32-40.

