

UNIVERSIDAD ABIERTA INTERAMERICANA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD



**EFFECTO OVICIDA DE LOS BISFOSFONATOS Y SU COMBINACIÓN CON
IVERMECTINA. PRUEBA DE CONCEPTO SOBRE LAS CÉLULAS EGPE Y
LAS ONCOSFERAS DE *Taenia hydatigena* Y *Echinococcus granulosus***

Autora:

Alejandra Yaqueline Juárez Valdez

Tutora:

Dra. Alicia Graciela Fuchs

Tesis presentada para la obtención del título de:

Magíster en Investigación Clínica Farmacológica

**El trabajo se realizó en el CAECIHS (Centro de Altos Estudios en Ciencias
Humanas y de la Salud) perteneciente a la Universidad Abierta
Interamericana**

Septiembre 2023

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la doctora Alicia Fuchs, mi tutora, por su buena disposición para guiarme y brindarme sus enseñanzas y consejos en el desarrollo de esta tesis.

A la doctora Andrea Maglioco y al Lic. Facundo Agüero quienes me han apoyado y compartido conmigo sus conocimientos.

A la doctora María Laura Gertiser y al doctor Oscar Jensen, del Centro de Zoonosis de Chubut, y al doctor Emilio Roldán, ex director científico de Gador S.A, por su gran colaboración en la realización de este trabajo.

A mi familia, por su apoyo y compañía en este proceso.

1. CONTENIDO

2. ABREVIATURAS Y SIGLAS	6
3. RESUMEN	8
5. INTRODUCCIÓN	10
5.1 Epidemiología de la Hidatidosis quística y cisticercosis causada por <i>Cysticercus tenuicollis</i>	10
5.2 <i>Echinococcus granulosus</i> sensu lato y <i>Taenia hydatigena</i>	10
5.2.1 Ciclo de Vida	10
5.2.2 Genotipificación y distribución geográfica	12
5.2.2.1 <i>Echinococcus granulosus</i>	12
5.2.2.2 <i>Taenia hydatigena</i>	14
5.2.3 Descripción de los estadios parasitarios y sus hospedadores	14
5.2.3.1 Estadio adulto- hospedador definitivo	14
5.2.3.2 Estadio larval o metacestode- hospedador intermediario	16
5.2.3.3 Oncosfera- hospedador medio ambiente	17
5.2.4 Composición química y metabolismo de <i>E. granulosus</i> y <i>T. hydatigena</i>	18
5.2.4.1 Composición química	18
5.2.4.2 Obtención de nutrientes y metabolismo general	18
5.2.5 Metabolismo lipídico	19
5.3 Equinococosis quística	21
5.3.1 Manifestaciones clínicas	21
5.3.2 Diagnóstico	21
5.3.2.1 Humanos u hospedador intermediario	21
5.3.2.2 Hospedador definitivo- perros domésticos	24
5.3.3 Tratamiento	24
5.3.4 Control y prevención	25
5.3.5 Interrupción del ciclo de transmisión	26
5.4 Bisfosfonatos	27
5.4.1 Generalidades	27
5.4.2 Mecanismos de acción	28
5.4.2.1 Bisfosfonatos No Nitrogenados (nNBF)	28
5.4.2.2 Bisfosfonatos Nitrogenados (NBF)	29
5.4.3 Farmacocinética de los bisfosfonatos	31
5.4.4 Efectos adversos	31
5.4.5 Bisfosfonatos como antiparasitarios	32

5.4.6	Utilización de los bisfosfonatos en medicina veterinaria	32
5.5	Ivermectina.....	33
5.5.1	Generalidades	33
5.5.2	Mecanismo de acción	33
5.5.3	Efectos adversos	34
5.6	Modelo celular <i>Echinococcus granulosus</i> protoescólices (EGPE).....	34
6.	HIPÓTESIS.....	35
7.	OBJETIVOS	36
7.1	Objetivo principal	36
7.2	Objetivos secundarios	36
8.	MATERIALES Y MÉTODOS	37
8.1	Materiales	37
8.1.1	Cultivo celular	37
8.1.2	Reactivos	37
8.1.3	Plásticos y otros	37
8.1.4	Equipos	38
8.2	Estudio in vitro	38
8.2.1	Preparación del medio de cultivo	38
8.2.2	Descongelamiento.....	38
8.2.3	Mantenimiento y repique celular.....	38
8.2.4	Congelamiento	39
8.2.5	Curva de crecimiento celular.....	39
8.2.6	Conteo celular	39
8.2.7	Colonias quísticas en agarosa	39
8.2.7.1	Preparación de los BF	39
8.2.8	Formación y tratamiento de las colonias de EGPE.....	40
8.2.8.1	Obtención de colonias quísticas de EGPE.....	40
8.2.8.2	Obtención de la Concentración Inhibitoria 50 (IC50) de Ivermectina sobre células EGPE	40
8.2.8.3	Tratamiento de las colonias de EGPE con bisfosfonatos.....	40
8.2.8.4	Tratamiento con ivermectina y su combinación con bisfosfonatos	
	41	
8.3	Estudio ex vivo.....	41
8.3.1	Obtención de muestras y tratamiento con bisfosfonatos e ivermectina	41
8.3.2	Análisis de viabilidad de las oncosferas	41
8.3.3	Análisis histológico e histoquímico.....	42

8.4	Análisis estadístico	42
9.	RESULTADOS	43
9.1	Estudio in vitro	43
9.1.1	Concentración inhibitoria 50 (IC ₅₀) de la ivermectina	43
9.1.2	Efecto del tratamiento con bisfosfonatos e ivermectina, como monodroga y en combinación sobre las colonias	43
9.1.2.1	Cantidad de colonias formadas	43
9.1.2.2	Evaluación de la densidad celular de colonias de EGPE	44
9.2	Estudio ex vivo	46
9.2.1	Viabilidad de las oncosferas contenidas en proglótides de <i>Taenia</i> <i>Hydatigena</i> y <i>Echinococcus granulosus</i>	46
9.2.2	Examen histológico en <i>T. hydatigena</i>	46
9.2.2.1	Cantidad de oncosferas en formación en <i>T. hydatigena</i> tratada con bisfosfonatos	46
9.2.2.2	Evaluación de la cantidad de oncosferas maduras en <i>Taenia</i> <i>hydatigena</i> tratada con bisfosfonatos	47
9.2.3	Análisis histoquímico en <i>Taenia hydatigena</i>	49
9.2.3.1	Depósito de calcio oncosferas maduras de <i>Taenia hydatigena</i> tratada con Bisfosfonatos	49
9.2.4	Evaluación del efecto del ácido zoledrónico y su combinación con la ivermectina en <i>Echinococcus granulosus</i> (Análisis histológico)	51
9.2.5	Escalamiento de los resultados a la investigación clínica farmacológica	54
10.	DISCUCIÓN	57
11.	CONCLUSIONES	62
12.	BIBLIOGRAFÍA	63

1. ABREVIATURAS Y SIGLAS

- *E. granulosus*: *Echinococcus granulosus* s.l.
- *T. hydatigena*: *Taenia hydatigena*
- BF: bisfosfonatos
- IV: ivermectina
- EHDP: Etidronato de sodio
- AZ: Ácido Zoledrónico
- BP: bisphosphonates
- HEDP: etidronate
- ZA: Zoledronic acid
- EQ: equinococosis quística
- AVAD: Años de vida ajustados por discapacidad
- EA: equinococosis alveolar
- ENP: equinococosis neotropical poliquística
- ENU: equinococosis neotropical unikuística
- ARN: ácido ribonucleico
- ADN: ácido desoxiribonucleico
- ATP: adenosín trifosfato
- TC: tomografía computarizada
- RM: resonancia magnética
- HAI: hemoaglutinación indirecta
- IFI: inmunofluorescencia indirecta
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- PAIR: Punción, Aspiración, Inyección y Reaspiración
- PPI: pirofosfato inorgánico
- nNBF: bisfosfonatos no nitrogenados
- NBF: bisfosfonatos nitrogenados
- IB: ibandrinato
- RIS: risedronato
- ODP: olpadronato
- FPPS: farnesilpirofosfato sintasa
- FPP: farnesildifosfato
- GGPP: geranilgeranildifosfato
- VO: vía oral
- VE: endovenosa
- *T.cruzy* : *Trypanosoma Cruzi*
- AINES: antiinflamatorios no esteroideos
- GluCl: canales de cloro mediados por glutamato
- GABA: ácido gamma-aminobutírico
- EGPE: *Echinococcus granulosus* protoescolices
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa
- COX-1: ciclooxigenasa-1
- WB: Western Blot
- CI50: Concentración inhibitoria 50
- DMSO: dimetilsulfóxido
- SFB: suero fetal bovino
- PBS: buffer fosfato salino
- Fd: factor de dilución
- OV: oncosferas viables

- ONV: oncosferas no viables
- ANOVA: análisis de varianza
- SD: desviación estándar
- TNF: factor de necrosis tumoral

2. RESUMEN

La equinococosis quística o hidatidosis es una zoonosis desatendida, endémica en América del Sur y de reporte obligatorio en Argentina. En zonas hiperendémicas se reportan hasta un 95% de casos de ganado infectado. En el periodo 2018-2021, se han confirmado 1691 casos en humanos. La enfermedad se caracteriza por el desarrollo de quistes hidatídicos de tamaños variables en distintos órganos del cuerpo como: riñones, bazo, huesos, sistema nervioso central, ojos, músculo y con mayor frecuencia hígado (67-89 %) y pulmones (10-15 %). En los pacientes suele haber un periodo asintomático de incubación de la enfermedad que puede abarcar muchos años, hasta que los quistes son suficientemente grandes para desencadenar manifestaciones clínicas. El tratamiento de la enfermedad es mayoritariamente quirúrgico, mediante la extracción del quiste, sin embargo, existe un gran riesgo de rotura y diseminación del líquido hidatídico lo que puede causar la muerte del paciente. El agente etiológico es el *Cestode Echinococcus granulosus* s.l. (*E. granulosus*), que tiene un ciclo de vida indirecto, en el cual está involucrado un hospedador definitivo (perros y otros cánidos) que incuban el parásito hasta su maduración y expulsión de los huevos fértiles en las heces, estos se diseminan contaminando el alimento de los hospedadores intermediarios (animales ungulados) que desarrollan el metacestode en los órganos, principalmente en hígado y pulmón. En ser humano ingresa al ciclo del parásito como un hospedador intermediario accidental. Mientras que la *Taenia Hydatigena* (*T. hydatigena*) es el parásito causante de la cisticercosis, una parasitosis desatendida y endémica, es un *Cestode* comparable al *E. granulosus* debido a que comparten características estructurales y funcionales, además de tener ciclos de vida similares.

Las medidas de prevención primarias como la desparasitación de los perros no son efectivas, pues los agentes antiparasitarios no son ovicidas.

En este trabajo, se buscó evaluar el efecto antiparasitario de los bisfosfonatos (BF), fármacos análogos del pirofosfato inorgánico, de eficacia y seguridad conocidas, y la ivermectina (IV), que es un antiparasitario, de interés en hidatidosis por su efecto protoescolicida. Ambos tratamientos se probaron por separado y en combinación, en un estudio in vitro, sobre células de EGPE obtenidas de protoescolices de *E. granulosus* provenientes de un quiste hidatídico bovino, con capacidad formadora de colonias quísticas, observándose el efecto antiproliferativo de los BF, IV y la combinación, siendo el etidronato (EHDP), el BF más efectivo en la disminución del número de colonias formadas por EGPE y la reducción de la densidad celular.

En el estudio ex vivo se trataron proglótides de *T. hydatigena* y *E. granulosus*, con BF, se evaluó la viabilidad de las oncosferas contenidas en las proglótides, la cantidad de oncosferas maduras e inmaduras y el depósito de calcio embrionario. Se observó que EHDP inhibe la maduración de las oncosferas en *T. hydatigena*, mientras que el ácido zoledrónico (AZ), reduce la viabilidad de las oncosferas en sus dos estadios de maduración, además de favorecer el almacenamiento de calcio en el embrión. La IV potencia el efecto de ambos BF. Y, en *E. granulosus*, se observó que el AZ impide la liberación de los huevos al exterior de la proglótide. Una posterior evaluación microscópica del medio nutritivo de incubación del parásito con los tratamientos, mostró que IV y la combinación AZ+IV produjeron estructuras hialinas, lo que sugeriría inactivación de las oncosferas.

Estos resultados, permiten la proyección de un estudio clínico farmacológico de Fase II, en perros, para evaluar la efectividad antiparasitaria de los BF en monodroga o en combinación con IV.

4. ABSTRACT

Cystic echinococcosis (CE) is a neglected zoonosis endemic in South America and mandatorily reportable in Argentina. In hyperendemic areas, up to 95 % of livestock cases are reported. During the period 2018-2021, 1691 cases in humans were confirmed. The disease is characterized by the development of hydatid cysts of varying sizes in different organs of the body, such as kidneys, spleen, bones, central nervous system, eyes, muscles, and most frequently, the liver (67-89 %) and lungs (10-15%). Patients often experience an asymptomatic incubation period that can span many years until the cysts are sufficiently large to trigger clinical manifestations. The primary treatment for the disease is surgical, involving cyst removal; however, there is a significant risk of rupture and dissemination of hydatid fluid, which can result in the patient's death.

The causative agent is the *Cestode Echinococcus granulosus*, which has an indirect life cycle involving a definitive host (dogs and other canids) that incubates the parasite until it matures and expels fertile eggs in feces. These eggs contaminate the food of intermediate hosts (ungulate animals) that develop the metacestode in organs, primarily in the liver and lungs. In humans, the parasite enters the cycle as an accidental intermediate host.

Taenia hydatigena is the parasite responsible for cysticercosis, another neglected and endemic parasitosis. It is a *Cestode* comparable to *E. granulosus*, sharing structural and functional characteristics as well as similar life cycles.

Primary prevention measures such as deworming dogs are not effective because antiparasitic agents are not ovicidal.

This study aimed to evaluate the antiparasitic effect of bisphosphonates (BP), drugs analogous to inorganic pyrophosphate, with known efficacy and safety, and ivermectin (IV), an antiparasitic drug of interest in CE due to its protoescolicidal effect. Both treatments were tested separately and in combination in an in vitro study using EGPE cells obtained from *E. granulosus* protoscoleces from a bovine hydatid cyst with the ability to form cystic colonies. The antiproliferative effect of BP, IV, and the combination was observed, with etidronate (HEDP) being the most effective BP in reducing the number of colonies formed by EGPE and reducing cell density.

In the ex vivo study, proglottids of *T. hydatigena* and *E. granulosus* were treated with BF, and the viability of the oncospheres contained in the proglottids, the quantity of mature and immature oncospheres, and embryonic calcium deposition were evaluated. HEDP was found to inhibit the maturation of oncospheres in *T. hydatigena*, while zoledronic acid (ZA) reduced the viability of oncospheres in both stages of maturation, as well as promoting calcium storage in the embryo. IV potentiated the effect of both BP.

In *E. granulosus*, ZA was observed to prevent the release of eggs from the proglottid to the external environment. A subsequent microscopic evaluation of the parasite's incubation nutrient medium with the treatments showed that IV and the combination of ZA+IV produced hyaline structures, suggesting oncosphere inactivation.

These results allow for the projection of a Phase II clinical pharmacological study in dogs to evaluate the antiparasitic effectiveness of BP by itself or in combination with IV.

5. INTRODUCCIÓN

5.1 Epidemiología de la Hidatidosis quística y cisticercosis causada por *Cysticercus tenuicollis*

La hidatidosis o equinocosis quística (EQ) y la cisticercosis causada por *Cysticercus tenuicollis* son parasitosis, provocadas por el estadio larvario de *E. granulosus* y *T. hydatigena*, respectivamente. La hidatidosis quística, una zoonosis que se encuentra dentro de las 17 enfermedades prioritarias desatendidas de la Organización Mundial de la Salud y es de reporte obligatorio en Argentina; afecta tanto a la salud humana como animal **(1) (2)**.

En regiones endémicas, la tasa de incidencia de hidatidosis en humanos asciende a más de 50 por 100 000 personas-año, alcanzando una prevalencia de 5 a 10 % en zonas hiperendémicas. En 2015, se estimó que la hidatidosis causa la pérdida de 871 000 AVAD. Por otro lado, la prevalencia de hidatidosis en ganado varía del 20% al 95% de los animales sacrificados en zonas rurales, llegando a reportarse pérdidas en la industria ganadera mundial estimadas en US\$ 3000 millones **(1)**.

Los países más afectados en América del sur son: Argentina, Brasil, Chile, Perú y Uruguay, quienes conforman la Iniciativa del Proyecto Subregional del Cono Sur de Control y Vigilancia de la Hidatidosis, reportando en el periodo 2009-2014, 28 326 casos humanos con una letalidad de 2,9 %; siendo 15 % los casos registrados de muertes en menores de 15 años, esto indica la infección activa en el medio ambiente resultando en nuevos casos.

Entre los años 2010 y 2015, se registraron en Argentina, un total de 3916 casos. Las zonas con mayores niveles endémicos en el país son Buenos Aires, Santa Fe, Salta, Entre Ríos, Corrientes y las zonas de la región patagónica **(1)**.

La convivencia del ser humano, ganado y perros parasitados y la existencia de diferentes factores culturales, educativos, sanitarios y económicos hacen posible el mantenimiento del ciclo de la enfermedad.

El ser humano tiene una gran importancia epidemiológica al ser responsable de favorecer la perpetuación del parásito en su entorno, debido a ciertos hábitos como la faena domiciliaria, la alimentación de los perros con vísceras crudas, la falta de higiene en el consumo de alimentos, etc. **(3)**. Además, hay que considerar que el comportamiento humano, como las migraciones o la actividad económica como la compra de ganado de otras regiones puede implantar la infección en territorios libres de la parasitosis.

No hay datos epidemiológicos de la infección con *T. hydatigena* en humanos porque no es de registro obligatorio y no es infectiva en humanos.

5.2 *Echinococcus granulosus sensu lato y Taenia hidatigena*

5.2.1 Ciclo de Vida

Ambos *Cestodes* presentan un ciclo de vida indirecto porque necesitan de dos hospedadores para completarlo. Los hospedadores definitivos, como perros u otros cánidos, se infectan al ingerir vísceras con quistes fértiles que contienen protoescolices, varios en el caso del *E. granulosus* y un único protoescolice en el caso de la *T. hidatigena*. Éstos se evaginan y adhieren al intestino delgado donde el parásito se desarrolla hasta su forma adulta que, por su naturaleza hermafrodita, presenta órganos sexuales masculinos y femeninos, alcanzando su madurez sexual tras 4-5 semanas post-infección. Poseen tres proglótides; la proglótide terminal o

grávida puede contener un promedio de 586 huevos fértiles que son eliminados en la materia fecal del hospedador definitivo (4).

Se ha registrado que los huevos de los parásitos pueden sobrevivir en el ambiente, en condiciones de temperatura y humedad adecuadas, hasta 294 días para *E. granulosus* y hasta 42 semanas para *T. hydatigena*; contaminando grandes extensiones de terreno y agua al ser diseminados por acción del viento, las aves, insectos, animales, etc. Además, los huevos también quedan adheridos al pelaje y hocico del perro (2).

En el ciclo de vida para del *E. granulosus*, los hospedadores intermediarios son los animales ungulados, que, en el ciclo domiciliario son los ovinos, caprinos, cerdos, camélidos y vacas, y en casos esporádicos accidentales se presenta en gatos domésticos y en humanos (5). El hospedador intermediario se infecta por la ingestión de las oncosferas que se activan en el intestino permitiendo la penetración del parásito a través de la pared intestinal, diseminándose posteriormente en el organismo a través de la circulación sanguínea y linfática. El parásito se asienta con mayor frecuencia en el hígado y en los pulmones. En los órganos del hospedador intermediario la oncosfera pasará a su estado larval formando el quiste hidatídico (metacestode) (Figura 1.a) (4).

A pesar de que el ser humano está considerado como un hospedador accidental porque el ciclo parasitario se interrumpe, no hay que descartar que en determinadas circunstancias el hombre puede convertirse en un hospedador intermediario efectivo, como ha sido estudiado en Turkana (6).

En el ciclo de vida de *T. hydatigena*, los huevos eliminados por los hospedadores definitivos, son ingeridos por ovinos, bovinos y porcinos, que actúan como hospedadores intermediarios, donde eclosionan gracias al jugo gástrico del hospedador, liberando los embriones que viajan al hígado a través del sistema de la vena porta donde el parásito inicia su desarrollo hasta transformarse en un cisticerco, que, instalado en el órgano madurará en 35 a 50 días (Figura 1.b) (7) (8).

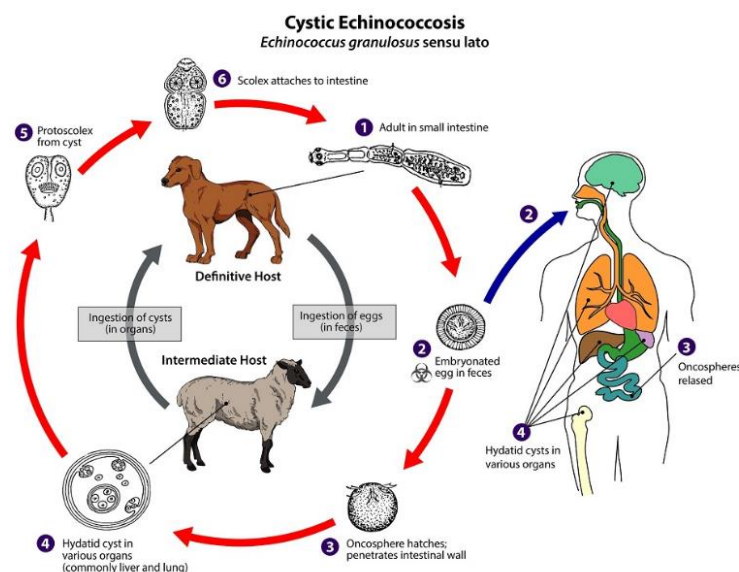


Figura 1.a. Ciclo biológico del *E. granulosus* s.l. (Modificado de CDC, 2019).

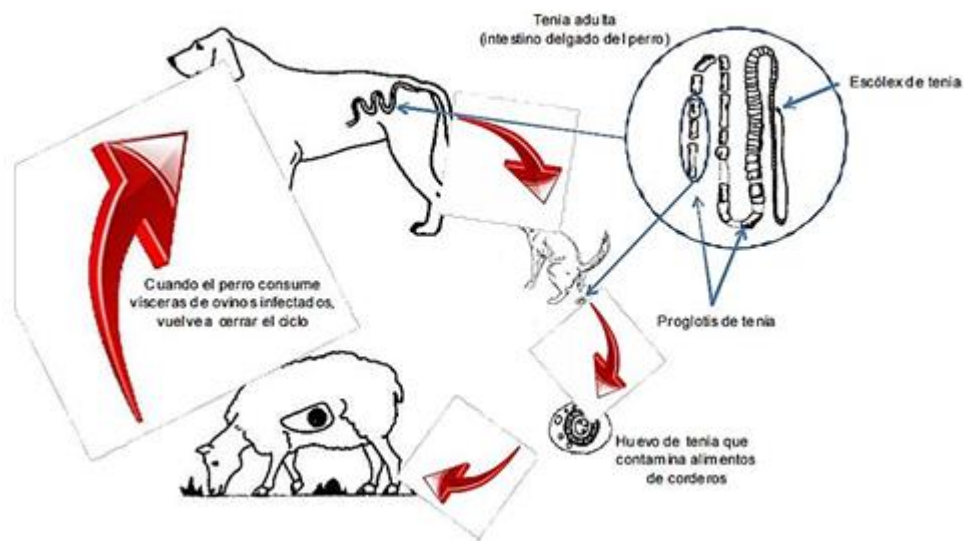


Figura 1.b. Ciclo evolutivo de la *T. hydatigena* (Modificado de Aguilera M, 2021) (9) .

5.2.2 Genotipificación y distribución geográfica

5.2.2.1 *Echinococcus granulosus*

El género *Echinococcus* incluye parásitos del *Phylum Platyhelminthes*, Clase *Cestoda*, orden *Taeniidea*, Familia *Taeniidae*. Estudios filogenéticos basados en la secuencia nucleotídica de los genes mitocondriales y proteínas nucleares, demuestran la existencia de cinco especies pertenecientes al género, que son: *Echinococcus multilocularis*, que provoca equinococosis alveolar (EA), *Echinococcus vogeli*, *Echinococcus oligarthrus*, ambos causantes de la equinococosis neotropical poliquística (ENP) y uniquística (ENU), *Echinococcus shiquicus*, que aún no hay evidencia de ser patógena para los humanos; y *Echinococcus granulosus* sensu lato (*E. granulosus*), causante de la equinococosis quística o hidatidosis (1).

Dentro de la especie *E. granulosus* se han identificado distintos genotipos: *E. granulosus* sensu stricto (s. s.) genotipos G1 (G2) y G3; *Echinococcus equinus* (genotipo G4); *Echinococcus ortleppi* (genotipo G5); *Echinococcus canadensis* que agrupa a los genotipos G6, G7, G8 (G9) y G10; y *Echinococcus felidis* (10) (11).

Las especies incluidas en el género *Echinococcus*, están presentes en todos los continentes, sin embargo, existen variaciones en las localizaciones geográficas, sus hospedadores y órganos que afectan, como se muestra en la Tabla N°1.

Espece	Distribución geográfica	Hospedador definitivo	Hospedador intermedio	Órgano afectado
<i>E. granulosus</i>	Cosmopolita	Perros y otros cánidos.	Ungulados, primates, marsupiales, humanos.	Principales: hígado y pulmón, pero puede encontrarse en todos los órganos.
<i>E. multilocularis</i>	Norte y Centro de Eurasia; Norte de Norte América	Zorros, perros y otros cánidos.	Roedores arvicolinos, humanos	Hígado
<i>E. oligarthrus</i>	América Central y del Sur	Gatos, felinos silvestres.	Agutíes, pacas, ratas, humanos.	Músculo y vísceras
<i>E. vogeli</i>	América Central y del Sur	Perro salvaje (<i>Speothos venaticus</i>) y perro doméstico.	Pacas, agutíes, humanos.	Hígado, pulmón, otros.
<i>E. shiquicus</i>	Meseta Qinghai (Tíbet)	Zorro tibetano.	Plateu Pika	Hígado y pulmón.

Tabla N°1: Especies del género *Echinococcus*. (Adaptado de: La Hidatidosis en la Argentina, 2019) **(1)**.

La distribución geográfica y rango de hospedadores de los genotipos del complejo *E. granulosus*; se describen en la tabla N°2. El genotipo más frecuente en el mundo y que produce quistes hidatídicos fértiles en ovejas y humanos es G1 englobado en el grupo *E. granulosus* s.s. **(1) (4)**

Grupo	Genotipo	Distribución geográfica	Hospedador definitivo	Hospedador intermediario	Infección en el humano
<i>E. granulosus</i> s.s	G1	Mundial	Perros	Ovejas, vacas, cerdos, cabras, camélidos	Sí
	G2			Ovejas, vacas	
	G3			Búfalos, ovejas, vacas	Sí
<i>E. equinus</i>	G4	Mundial	Perros	Caballos, burros	No reportado
<i>E. ortleppi</i>	G5	Mundial	Perros	Vacas	Sí
<i>E. canadensis</i>	G6	Mundial	Perros	Camellos, cabras, vacas	Sí
	G7	Mundial	Perros	Cerdos, vacas	Sí
	G8	Norte Ártico y Boreal	Lobos	Cérvidos	Sí
	G10	Norte Ártico y Boreal	Lobos y perros	Cérvidos	Sí
<i>E. felidis</i>	(león)	África	Leones	Desconocido	No reportado

Tabla N°2: Distribución geográfica de los genotipos del complejo *E. granulosus* s.l (Adaptado de: La Hidatidosis en la Argentina, 2019) (1).

5.2.2.2 *Taenia hydatigena*

La *Taenia hydatigena* (*T. hydatigena*), conocida también como *Cysticercus tenuicollis*, pertenece al *Phylum Platyhelminthes*, Clase *Cestoda*, Orden *Cyclophyllidea*, Familia *Taeniidae*, Género *Taenia*, Especie *Hydatigena*. Es el agente responsable de la cisticercosis, parasitosis provocada por su estadio larvario (8).

La infección por este parásito es endémica en América del Sur, existen reportes de la Patagonia Argentina, que en los años 2012-2015 se decomisaron 78 % de vísceras de infectadas con *Cysticercus tenuicollis* en ovinos en la localidad de Santa Cruz. En Zaragoza, España se registró una incidencia de la infección de ganado con *Cysticercus tenuicollis* de 85,5 %. (12).

Debido a que esta parasitosis no está incluida en la lista de infecciones de reporte obligatorio, los datos publicados son escasos, sin embargo, no se tiene registro de infecciones en humanos.

5.2.3 Descripción de los estadios parasitarios y sus hospedadores

5.2.3.1 Estadio adulto- hospedador definitivo

La tenia adulta del *E. granulosus* tiene un tamaño aproximado de 2 a 6 mm de longitud. En la región que corresponde a la cabeza o escólex, se distribuyen cuatro ventosas y una protuberancia llamada rostelo que contiene una doble corona de ganchos que permiten la fijación del parásito en el intestino delgado del perro (7).

La *T. hydatigena* mide de 75 cm a 500 cm de largo, el escólex consta de un rostelo que tiene una doble corona de 26 a 44 ganchos, permitiendo al parásito fijarse a la mucosa del intestino delgado del hospedador definitivo y la absorción de nutrientes (13).

A continuación del escólex se encuentra la región del cuello, que une la cabeza con el cuerpo del parásito o estróbilo. El estróbilo está formado, por tres o cuatro proglótides, cada una de ellas es una unidad reproductiva hermafrodita con capacidad de originar huevos fértiles al momento de su maduración (1). La proglótide más cercana al cuello es sexualmente inmadura, en la segunda proglótide se encuentran los testículos, ovarios y poro genital; por último, en la proglótide final o grávida, sexualmente madura, se encuentra el útero que contiene huevos fértiles del parásito. (Figura 2). La naturaleza hermafrodita podría permitir la reproducción sexual o auto-inseminación, sin embargo, ninguna de estas posibilidades ha sido comprobada experimentalmente (7).

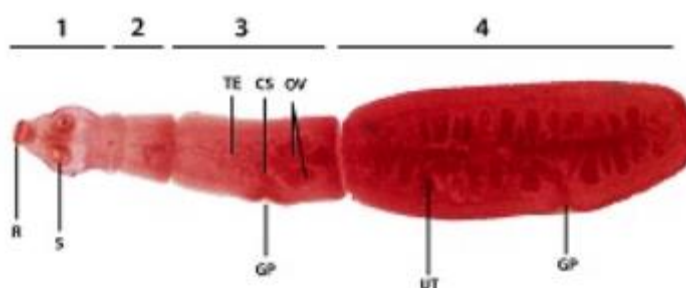


Figura 2: Tenia adulta del *E. granulosus*, donde: 1. Escólex; 2. Proglótide inmadura; 3. Proglótide madura; 4. Proglótide grávida. R. rostelo; S. ventosas del escólex; TE, CS y OV. Estructuras reproductoras. (Adaptado de CDC,2019) (4).

En el estadio adulto, el parásito, está cubierto por el tegumento, estructura formada por una zona superficial anucleada, distal y otra citoplasmática nucleada, proximal; es en la primera zona donde se encuentran proyecciones citoplasmáticas semejantes a las vellosidades intestinales, llamadas microtiquias, estas estructuras amplifican el área de absorción del parásito, además de aumentar la adhesión al intestino del hospedador. La membrana plasmática apical del tegumento está cubierta por el glicocálix producido por el parásito, que tiene la capacidad de degradar azúcares complejos, además de unir enzimas provenientes del parásito. El tegumento permite el mantenimiento del flujo de nutrientes como vitaminas, azúcares, lípidos, vitaminas, etc.; el transporte de iones y moléculas también funciona como órgano de protección contra enzimas digestivas y sistema inmune del hospedador, órgano auxiliar de locomoción y sitio de transferencia metabólica (14) (15). Debajo del tegumento hay músculo dispuesto en forma longitudinal y circular al eje longitudinal de la tenia.

Los elementos neuronales del parásito se encuentran en el escólex, constituido por un complejo de ganglios dentro de esta área; las fibras nerviosas están distribuidas a lo largo de las proglótides. Como en la mayoría de *Cestodes*, los cuerpos celulares (neuritas) están distribuidos periféricamente alrededor del neuropilo. Las células nerviosas no son capaces de dividirse por mitosis, por lo que las nuevas células nerviosas provienen de la diferenciación de células germinativas. Los neuropéptidos más importantes en el sistema nervioso del *E. granulosus* son serotonina (5-

hidroxitriptófano, 5-HT) y acetilcolina que desempeñan funciones excitatorias y de inhibición, respectivamente, sobre todo en los procesos de contractibilidad y relajación neuromuscular del parásito (7).

La excreción es dependiente de un sistema protonefridial, con células flamígeras que pueden aparecer en cualquier parte del cuerpo del parásito incluyendo el sistema nervioso central y vasos colectores longitudinales (7) (16).

5.2.3.2 Estadio larval o metacestode- hospedador intermediario

Llamado también hidátide, o forma larval se constituye en una vesícula unilocular, que contiene al líquido hidatídico. El quiste está delimitado por dos capas; la capa externa o capa laminar, de naturaleza mucoproteica y acelular, generada por células de la segunda capa denominada germinativa. La capa laminar, se compone de polisacáridos y complejos proteicos cumpliendo la función de soporte, resistencia y el mantenimiento de las células protegidas del sistema inmune del hospedador, además de permitir el pasaje de macromoléculas (de hasta 150 kDa) como nutrientes y productos de desecho con el hospedador. (10)

La capa germinativa, de naturaleza celular, está compuesta por dos zonas: el sincicio celular distal y la zona proliferativa. La primera zona mide de 1 a 2 mm, tiene un color blanquecino, es frágil y está constituida por el citoplasma distal de las células tegumentarias, de donde se proyectan las micotriquias que se insertan en la capa laminar. La zona proliferativa que tiene alrededor de 20 μ m de grosor, está compuesta por la zona perinuclear de las células tegumentarias, células musculares, flamígeras y células con reservas de glucógeno, además de células indiferenciadas con capacidad proliferativa, las cuales producen las vesículas prolíferas en las que se generan los protoescolices, por reproducción asexual (Figura 3). (14) (15) (17)

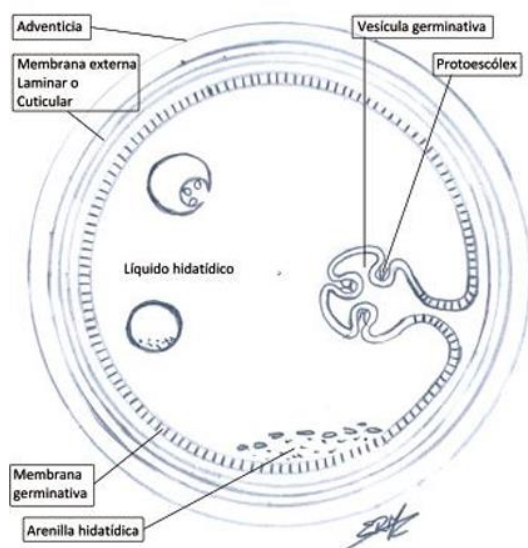


Figura 3. Estructura del quiste hidatídico. (Extraído de González D, Olivera E. Relato, 2011) (18)

El metacestode está cubierto por una capa fibrosa compuesta por colágeno, llamada adventicia que está originada por la respuesta inflamatoria del hospedador. La aparición de esta capa está asociada con la exitosa adaptación del parásito al hospedador, dando origen a quistes hidatídicos fértiles (15).

El líquido hidatídico se encuentra en la cavidad del metacestode tiene una densidad de 1,007 a 1,012 g/mL y un pH de 7,4 **(19)** y contiene los productos del metabolismo, compuesto por complejos glicoproteicos, lipoproteínas (como antígeno B y 5), carbohidratos y elementos como Na, K, Mg, Cu, Fe y P. Además, componentes del hospedador como albúmina e inmunoglobulinas. **(15)**. La “arenilla hidatídica” está compuesta por vesículas prolíferas, escólices, protoescólices y vesículas hijas y los ganchos, liberados de los escólices no viables **(16)**.

El protoescólice o embrión producido en forma asexual, surge de la capa germinal del metacestode, entre los 10 y 16 meses luego de la infección. Se produce una agrupación de células, que da lugar a un brote que sufre un proceso de alargamiento hasta la formación del escólex y tallo. En la parte con la mayor densidad celular (escólex) se forman la doble corona de ganchos y se diferencia la zona del rostelo; además, se originan prolongaciones laterales de las cuales se formarán las ventosas. El tallo se alarga aumentando la distancia entre el cuerpo del protoescólice y la capa germinal. Una vez que el protoescólice ha madurado se desprende de la capa germinal y queda liberado en el líquido hidatídico. **(20)** Los protoescólices están recubiertos por el tegumento. Los protoescólices maduran hasta adquirir el escólex, ganchos, rostelo y ventosas **(17)** que le permite ser infectivo para el hospedador intermediario.

El estadio infectivo de *T. hydatigena* es una vesícula donde se encuentra un único protoescólice rodeado de líquido, pueden llegar a tener hasta 1 cm de diámetro. Un solo huésped puede presentar cientos de quistes y si bien el hígado es el órgano comúnmente afectado, la *T. hydatigena* puede formar quistes en toda la cavidad abdominal **(21)**.

La infección causada por el parásito es generalmente asintomática, sin embargo, en cuadros agudos pueden presentarse hepatitis y peritonitis e incluso producir la muerte espontánea en cerdos jóvenes, debido a hemorragias **(13)**.

5.2.3.3 Oncosfera- hospedador medio ambiente

Los huevos maduros de *E. granulosus* y *T. hydatigena* miden alrededor de 30 x 35 µm, tienen una forma ovoide o elipsoidal. La principal capa protectora es el embrióforo, que se constituye principalmente por bloques poligonales de queratina, esta capa está sostenida a cápsula de la oncosfera (embrión) por una sustancia cementante; lo que le da al huevo una apariencia radial estriada; cabe resaltar, que el embrióforo en la *T. hydatigena*, no le confiere la misma protección que al *E. granulosus*, debido a que los bloques de queratina que lo constituyen son más delgados y tienden a romperse por acción mecánica al ser expulsados al ambiente **(22) (23)**.

La formación del huevo se da cuando una sola célula vitelina interacciona con el ovocito y libera gránulos secretorios que forman la cápsula embrionaria o de la oncosfera (constituida por lipoproteínas); la cual los engloba. Debido a la participación de una única célula vitelina en la formación de la capa vitelina, ésta es delgada y frágil, además, se pierde una vez que el huevo es eliminado en las heces del perro, por lo que la falta de protección es de la misma es compensada por la estructura gruesa del embrióforo **(7)**.

La oncosfera está compuesta por tres pares de ganchos (embrión hexacanto) sostenidos por un complejo sistema muscular, además de células glandulares y germinales **(15)**.

Cuando un huevo eclosiona, lo que debe ocurrir primero es la desintegración de los bloques de queratina del embrióforo, que resulta de la disolución enzimática por parte del hospedador, para que la oncosfera sea infectiva, se activa en el intestino delgado

por la composición enzimática y química de los jugos digestivos. Al ser liberada, la oncosfera penetra las vellosidades intestinales y llega al hígado y a otros órganos, a través de la circulación sanguínea, al establecerse en el órgano se genera el metacestode (7) (15).

5.2.4 Composición química y metabolismo de *E. granulosus* y *T. hydatigena*

5.2.4.1 Composición química

Los análisis químicos de *Cestodes* como *E. granulosus*, dependen del origen del parásito, hospedador y órgano de implantación debido a los intercambios que se efectúan entre los dos sistemas. (7)

En el parásito, los carbohidratos se presentan mayormente como glucógeno, aproximadamente, el 19,8 % del parásito está representado por este polisacárido. Otros compuestos comunes como mucopolisacáridos (glucosamina, galactosamina y ácido glucurónico) forman parte del glicocáliz y están presentes en el tegumento y microtriquias, junto a glicoproteínas. En cuanto al quiste hidatídico, se ha encontrado un complejo polisacárido-proteína formando la capa laminar del mismo, donde la parte correspondiente al carbohidrato está compuesta por galactosa, galactosamina y glucosamina (7).

En muchas especies de *Cestodes* están presentes láminas concéntricas compuestas de elementos orgánicos e inorgánicos, denominadas, corpúsculos calcáreos. En el *E. granulosus*, estas estructuras miden de 16 a 32 μm y son más extensas en comparación al promedio de 12 μm observado en otros *Cestodes*. Su estructura son cristales de carbonato de calcio y fosfato de calcio similares a la hidroxiapatita (7).

Los componentes de los corpúsculos calcáreos son: calcio, magnesio, carbono y fosfatos; y contienen ARN, ADN, proteínas, polisacáridos, lípidos y fosfatasa alcalina. Los corpúsculos calcáreos, si bien no se conoce su función exacta, podrían actuar como reservorio de calcio, como reguladores para ácidos producidos anaeróbicamente y ácido clorhídrico proveniente del estómago del hospedador; funcionar también como reserva de iones y dióxido de carbono de donde provienen las moléculas de fosfato para reacciones de fosforilación, y iones que sirven como cofactores para la síntesis rápida de ATP al momento de la fijación del parásito en el intestino del hospedador (7).

5.2.4.2 Obtención de nutrientes y metabolismo general

Estos parásitos se caracterizan por la adaptación a los ambientes a los que se exponen durante las fases en su ciclo de vida, donde la disponibilidad de nutrientes y oxígeno es variable; además de ajustar el uso de sus vías fermentativas para ser dependientes exclusivamente de carbohidratos para la generación de energía (15).

En los estadios de vida libre del parásito, su metabolismo es aerobio, obteniendo energía de glucógeno por medio de fosforilación oxidativa y ciclo de Krebs. En esta fase la energía se obtiene gastando la menor cantidad posible de las reservas sus reservas de glucógeno con el objetivo de sobrevivir el tiempo necesario hasta interactuar con el hospedador, donde su metabolismo pasa a ser anaerobio (15) (24).

Una vez establecido en el hospedador, la energía es obtenida por fermentación láctica mediante glucólisis anaerobia, a partir de la glucosa proveniente del hospedador; después de este procedimiento el parásito obtiene dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa. Sin embargo, existe otra vía fermentativa de obtención de energía conocida como dismutación del malato, donde después de la reducción de fosfoenolpiruvato a malato, éste es transportado a la mitocondria para oxidarse a

acetato, que en una cadena de reacciones reductivas se tiene como resultado fumarato que, empujando rodoquinona, actúa como aceptor de electrones en lugar del oxígeno (23).

En el *E. granulosus*, las rutas biosintéticas han sido reducidas al mínimo, por lo cual, dependen del hospedador para la obtención de sustratos que luego serán usados para la construcción de otras moléculas; un ejemplo es su incapacidad de sintetizar glucosa, por lo cual, este carbohidrato es obtenido del hospedador para ser convertido en glicoproteínas, glucógeno y complejos del glicocálix (15).

Ha sido descrito que la oxidación de aminoácidos y los lípidos no constituyen una fuente importante de energía para el parásito, debido a la escasa presencia de oxígeno (7) (15).

5.2.5 Metabolismo lipídico

Los lípidos tienen un rol importante en la regulación enzimática, reconocimiento e interacción de células, síntesis de glicoproteínas y expresión de antígenos de superficie y son los mayores constituyentes de las membranas parasitarias. Además, las lipoproteínas pueden ser altamente antigénicas, como el antígeno B y antígeno 5 presentes en el líquido hidatídico. Los fosfolípidos presentes en los protoescolices son fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, fosfatidilinositol y esfingomielina (7).

Estos *Cestodes* no tienen la capacidad de sintetizar esteroides, como el colesterol desde acetil coenzima A (acetil-CoA), por lo que este lípido se obtiene del hospedador, ingresando al quiste hidatídico por difusión simple como un éster. Los protoescolices son capaces de convertir los ésteres de colesterol por hidrólisis, procedimiento que fue comprobado al detectar la presencia de secuencias que codifican O-aciltransferasa y colesterol esterasa, enzimas que intervienen en la transformación de los ésteres (25).

Se ha determinado la capacidad del *E. granulosus* para la síntesis de esteroles a partir de isoprenoides como el farnesil pirofosfato, un intermediario de la vía del mevalonato; que cumple un importante papel en el desarrollo del parásito, que junto al geranilgeranil pirofosfato, actúan como sustratos en la isoprenilación de proteínas. La importancia de la vía del mevalonato, en estos parásitos, radica también en la síntesis de dolicoles para la glicosilación de proteínas (15).

A continuación, se presenta un cuadro resumen con las principales características descritas de ambos parásitos. (Tabla N°3)

CARACTERÍSTICAS	<i>E. granulosus</i>	<i>T. hydatigena</i>
Enfermedad	Equinococosis quística o hidatidosis	Cisticercosis
Ciclo de vida	- Hospedador definitivo: Perro y otros cánidos - Hospedador intermediario: Ovinos, caprinos, porcinos, Bovinos.	- Hospedador definitivo: Perro y otros cánidos - Hospedador intermediario: Ovinos, caprinos, porcinos, Bovinos.
Estadios	- Adulto - Larva: metacestodo - Huevo - Protoescólice	- Adulto - Larva: cisticerco - Huevo - Protoescólice
Adulto	- 2 – 6 mm - 3 -4 proglótides - Escólex: 4 ventosas y rostelo. - Reproducción por autoinseminación o fertilización cruzada.	- 75 – 500 cm - Escólex: 4 ventosas y rostelo. - Reproducción por autoinseminación o fertilización cruzada.
Huevos	- 30 x 34 μm - Cápsula embrionaria o embrióforo: Bloques de queratina (mayor protección) - Capa vitelina: formada de una única célula. - Oncósfera	- 38 x 34 μm - Cápsula embrionaria o embrióforo - Capa vitelina: formada de una única célula. - Oncósfera
Forma infectiva	- Estadio larvario	- Estadio larvario
Composición química:		
Lípidos:	Lípidos en general: 13,6% Fosfatidilserina, Fosfatidilcolina Esingomielina Fosfatidilinositol Glicofosfolipidos	Lípidos en general: 4,9% Fosfatidilserina Fosfatidilcolina Esingomielina Fosfatidilinositol
Carbohidratos:	Protoescólices y Adulto: Glucógeno (19,8%), Lactato, Succinato, Propionato, Piruvato, Malato, Citrato, Acetatos	Adulto: Glucógeno (28%), Lactato, Succinato, Propionato, Piruvato, Malato, Citratos, Acetatos.
Corpúsculos calcáreos:	Compuestos inorgánicos: Fosfatos (3 – 4%) Calcio, magnesio, carbonatos, fosfuros, Compuestos orgánicos: ARN, ADN, proteínas, glucógeno, mucopolisacáridos.	Compuestos inorgánicos: Fosfatos (11,9%) Calcio, magnesio, carbonatos, fosfuros, Compuestos orgánicos: ARN, ADN, proteínas, glucógeno, mucopolisacáridos.

Tabla N° 3: Comparación de las características de *E. granulosus* y *T. hydatigena*.
Adaptada de Smyth y McManus, 2007 (7).

5.3 Equinococosis quística

5.3.1 Manifestaciones clínicas

La enfermedad se caracteriza por el desarrollo de uno o más quistes hidatídicos de tamaños variables en distintos órganos del cuerpo como: riñones, bazo, huesos, sistema nervioso central, ojos, músculo y con mayor frecuencia hígado (67-89 %) y pulmones (10-15 %) **(26)**.

En los pacientes, suele haber un periodo asintomático de incubación de la enfermedad que puede abarcar muchos años, hasta que los quistes son suficientemente grandes para desencadenar manifestaciones clínicas. Dada a la mayor resistencia del tejido circundante hepático, debido a sus características estructurales, los quistes tienen un crecimiento más lento, por lo que, muchas personas permanecen en el periodo asintomático toda su vida. Contrario a lo que se observa en el pulmón, que, al presentar tejido elástico, determina un crecimiento del quiste relativamente rápido, y como consecuencia, la aparición de síntomas clínicos en un gran porcentaje de pacientes.

De acuerdo con el sitio de implantación del quiste, los pacientes presentan distintos signos y síntomas clínicos:

- Hidatidosis hepática: dolor abdominal (epigastrio e hipocondrio derecho) y hepatomegalia; náuseas vómitos o trastornos digestivos dispépticos. En algunos casos, debido a la apertura de los conductos biliares, se manifiesta ictericia obstructiva **(26)**.
- Hidatidosis pulmonar: Tos crónica, dolor torácico, disnea, fiebre, entre otros. Es posible la eliminación del contenido del quiste por un acceso de tos (vómica) **(3) (26)**.
- Hidatidosis ósea y muscular: Algunos síntomas iniciales inespecíficos como dolor, masa tumoral, impotencia funcional del miembro. Fracturas espontáneas o compresión vascular **(3) (26)**.
- Afectación al sistema nervioso central: hipertensión intracraneal, convulsiones o ataxia **(27)**.

5.3.2 Diagnóstico

5.3.2.1 Humanos u hospedador intermediario

El diagnóstico de la enfermedad está basado principalmente en el examen físico y antecedentes epidemiológicos, técnicas de imagen y pruebas serológicas. El diagnóstico de certeza está determinado por el hallazgo del parásito mediante microscopía, evaluando el fluido del quiste hidatídico o una muestra histológica **(26)**.

Los criterios que permiten sospechar de una infección hidatídica en un paciente son: presencia de masa quística, asociada con antecedentes epidemiológicos (vivienda, contacto con perros, familiares con la enfermedad), con o sin síntomas. Sospechas de la enfermedad por catastros poblacionales con ecografía. Se considera un caso confirmado cuando existe visualización directa de protoescolices o ganchos del *Cestode*, membranas o estudios histopatológicos de las muestras extraídas en cirugía; confirmación por imágenes y/o serología positiva mediante ELISA, Western Blot o Hemaglutinación **(3)**.

- Técnicas de imagen:

La prueba por imágenes más utilizada es la ecografía, debido a su accesibilidad, además de tener una sensibilidad y especificidad, en la detección de quistes hidatídicos de localización hepática, del 100 % y 96 %, respectivamente **(3)**. Esta

técnica permite la determinación del estadio de acuerdo con las variaciones estructurales en la evolución del quiste. La clasificación de lesión quística más utilizada es la establecida por Gharbi, existiendo otras más complejas como la del Grupo de trabajo de la equinococosis de la Organización Mundial de la Salud (OMS-IWGE) (Tabla N°4) **(1) (26)**.

Otras técnicas utilizadas son la radiografía convencional, útil en quistes pulmonares y óseos; la tomografía computarizada (TC) y resonancia magnética (RM), elegidas en quistes complicados con presencia de fistulas o abscesos y para quistes con localización extra abdominal **(3)**.

La ecografía, permite el diagnóstico, determinación de la ubicación, número y evaluación de complicaciones de los quistes de forma eficiente. Además de contribuir en mayor medida al diagnóstico diferencial de los quistes hidatídicos con otras lesiones quísticas no parasitarias, primordialmente de localización hepática **(1)**.

Tipo de quiste	Gharbi	OMS-IWGE	
CL	-	QH activo	Unilocular, con pared no visible (anecoico), no fértil. Otros medios de diagnóstico son requeridos.
Tipo I	Univesicular, contenido líquido homogéneo, membrana visible. Con o sin nevado Fértil.	Activo	Unilocular anecoico. Signos patognomónicos: Con nevado y Membrana definida. Usualmente fértil.
Tipo II	Desprendimiento de membrana.	Activo	Multivesicular, multiseptado, presencia de estructuras tipo panal de abejas. Membrana definida, las vesículas hijas puede rellenar parcial o totalmente al quiste univesicular. Usualmente fértil.
Tipo III	Multivesicular, con o sin matriz. Vitalidad disminuida. Posibilidad de complicación.	Transicional	Unilocular, con vesículas hijas, contenido anecoico, desprendimiento de membrana. Inicio de la involución.
Tipo IV	Sólido, heterogéneo, densidades variables con o sin calcificaciones parciales. Infértiles.	Inactivo	Heterogéneo, no hay vesículas hijas. Puede presentar membranas degeneradas. Infértiles.
Tipo V	Calcificados.	Inactivo	Pared calcificada, definida conforma de arco provocando un cono. Calcificación parcial o compre. Infértil. Altamente sugestivo de <i>E. granulosus</i>

Tabla N°4: Clasificación de lesión quística Gharbi y OMS-IWGE. (Adaptado de: La Hidatidosis en la Argentina, 2019) (1)

- Serología:

El diagnóstico serológico de la hidatidosis se utiliza como prueba confirmatoria de la enfermedad. Una fuente de antígenos importante para el inmunodiagnóstico es el líquido hidatídico, donde se encuentran el antígeno 5 y el antígeno B. que se consideran patognomónicos para esta infección (26).

En zonas endémicas de Argentina, la prueba más utilizada fue la técnica de doble difusión 5, debido a la facilidad en su realización e interpretación con una sensibilidad para hidatidosis hepática de 60 a 70 % (1).

Otras pruebas serológicas usadas en la actualidad son la hemoaglutinación indirecta (HAI), con una sensibilidad en hidatidosis hepática del 80 % y 65 % en la afección pulmonar; sin embargo, los resultados se pueden confundir con positivos para triquinosis y fascioliasis. La inmunofluorescencia indirecta (IFI) utiliza como antígeno cortes de escólices congelados en portaobjetos, tiene una sensibilidad para lesiones hepáticas de 85 a 90 %, sin embargo, la especificidad de la prueba es baja. La técnica de ELISA IgG es la prueba serológica de elección para el diagnóstico confirmatorio de la enfermedad con una sensibilidad del 93 %. Finalmente se usa Western Blot como prueba de confirmación ante ELISA positivos (3).

5.3.2.2 Hospedador definitivo- perros domésticos

Para la mejor comprensión del nivel de riesgo de transmisión del parásito, vigilancia y evaluación de la eficacia de los programas de control de la hidatidosis, es importante la identificación del *E. granulosus* en los perros, además de permitir identificar las áreas de mayor prevalencia de hospedadores definitivos infectados.

El diagnóstico en los hospedadores definitivos es efectuado mediante varios métodos, en los que se incluyen la detección directa de los huevos del *E. granulosus* en muestras de heces, sin embargo, la especificidad del método es baja pues los perros suelen estar infectados con otros parásitos y los huevos del *E. granulosus* no presenta grandes diferencias con los huevos de otros parásitos como la *T. hydatigena* (1).

Debido a esto, se han desarrollado técnicas para la detección de antígenos específicos del parásito presentes en las heces, los coproantígenos pueden provenir de proglótides, escólices, tegumentos, huevos y productos de excreción y degradación del parásito.

La prueba de ELISA es la técnica de elección para la detección de coproantígenos, con una sensibilidad de alrededor de 83 % y una especificidad entre 88 % a 96 %. Permite la detección de antígenos entre a 10 y 14 días después de la infección (27).

Otra prueba utilizada en la detección de coproantígenos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que consiste en amplificar una secuencia del gen mitocondrial de la subunidad uno del citocromo c oxidasa. El coproPCR, permite la identificación diferencial entre huevos de tenido, además de favorecer al procesamiento de una alta cantidad de muestras con riesgos bajos para el operador y el ambiente, al igual que la técnica de coproELISA (1) (27).

5.3.3 Tratamiento

Existen tres opciones de tratamiento de la hidatidosis, que son la cirugía y el tratamiento farmacológico o la cirugía y farmacología para la prevención de la diseminación intraoperatoria del parásito. La primera opción se constituye en la actualidad el tratamiento de elección para quistes pulmonares y hepáticos en pacientes sintomáticos. Sin embargo, gracias al diagnóstico temprano y la detección de quistes en pacientes asintomáticos mediante encuestas ecográficas, la forma de afrontar la enfermedad ha cambiado, optándose primero por un tratamiento farmacológico con albendazol (3).

Para decidir el tratamiento adecuado en un paciente, tener en cuenta factores individuales del paciente como edad, enfermedades previas, contraindicaciones particulares, control y posibilidad de seguimiento. A los pacientes que se les detecta un

quiste hepático se les debe realizar una radiología de tórax puesto que la afectación sincrónica de hígado y pulmón es usual. Además, es de suma importancia para elegir el plan de tratamiento para el paciente, plantear dos situaciones:

- Si el paciente es sintomático con quistes hidatídicos con o sin complicación: el tratamiento elegido es la cirugía. También es utilizado el albendazol antes de las cirugías con dosis de 10 a 15 mg/ kg/ día en dos tomas diarias cada 12 horas, durante 30 días previos a la fecha de cirugía y 60 días posteriores a la misma **(3) (28)**.

Se han propuesto esquemas de tratamiento que combina el albendazol y praziquantel 40 mg/ kg/ día una vez a la semana que podrían ser útiles en casos de derrame de contenido del quiste en cirugía. La combinación de ambos fármacos ha demostrado la generación de mayor inviabilidad de protoescolices que la monoterapia con albendazol, sin embargo, los efectos secundarios también se hacen mayores **(28)**.

- Si el paciente es asintomático y portador de un quiste hidatídico: luego de la confirmación de la parasitosis, el tratamiento se elige de acuerdo con el tipo de quiste siguiendo la clasificación de la OMS o Garbhi **(28)**.

- Tratamiento quirúrgico:

Este tratamiento tiene por objetivo erradicar el parásito, evitar la recidiva y disminuir la morbilidad, pudiéndose utilizar la cirugía convencional u otros procedimientos menos invasivos como la laparoscopia, útil para quistes de localización hepática, o PAIR (punción, aspiración, inyección y reaspiración). La toracotomía es el procedimiento de elección para quistes localizados en pulmones sobre todo aquellos que presentan complicaciones, también pudiéndose combinar con tratamiento farmacológico **(28)**.

- Tratamiento farmacológico:

Para el tratamiento farmacológico de la hidatidosis se utilizan fármacos de la familia de los benzimidazoles, siendo la droga de elección el albendazol, debido a su mayor absorción gastro intestinal y biodisponibilidad en comparación con otros compuestos de la familia; el tratamiento con este medicamento se realiza con dosis de 10 a 15 mg/ Kg/ días, dividido en dos tomas, luego del almuerzo y cena, debiendo mantenerse una dieta rica en grasas para permitir una mejor absorción de la droga, durante ciclos de 30 días. El periodo mínimo de tratamiento con albendazol varía entre 3 a 6 meses **(3)**. Acompañado a este medicamento se puede administrar omeprazol para la protección gastrointestinal. Las dosis máximas de albendazol son de 400 mg/ kg en niños y 800 mg/ kg en adultos **(28)**.

El efecto secundario más frecuente del albendazol es la intolerancia gastrointestinal, pero también pueden presentarse elevación de transaminasas hepáticas o depresión muscular. Generalmente, esta droga es bien tolerada por los pacientes, sin embargo, es necesario el seguimiento y control de los valores de transaminasas y glóbulos blancos, así como también ecografías y monitoreo de la evolución del paciente, puesto que alteraciones graves pueden suponer la suspensión del tratamiento. Además, no está recomendado su uso en niños menores de 2 años **(3) (28)**.

5.3.4 Control y prevención

Las medidas dirigidas a la reducción de factores de riesgo, conocimiento del avance y disminución de las consecuencias de la enfermedad, se pueden clasificar en tres niveles de prevención:

- Prevención primaria:
Tiene el objetivo de evitar que se adquiera la enfermedad, las acciones que se realizan son la desparasitación del perro en forma periódica cada 6 meses, dependiendo de las leyes de cada país, y evitar la infección de los canes por la ingesta de vísceras infectadas **(1)**.
- Prevención secundaria:
En este nivel se busca la prevención de la enfermedad mediante estrategias de educación para salud y protección de personas sanas. Con la educación se pretende el cambio de conductas sanitaria en las personas, priorizando los niños. Las acciones son difundir información acerca del ciclo parasitario de la enfermedad, enfatizando al perro como trasmisor de la enfermedad, la importancia de las desparasitaciones, el no alimentar a los perros con vísceras crudas y la forma correcta de faenar animales en ubicaciones donde se evite el acceso de los canes con el fin de lograr la eliminación de las vísceras de forma segura, utilizando los pozos. La detección temprana se realiza por catastro con ecográfico abdominal en poblaciones rurales en niños y jóvenes con la finalidad de disminuir la morbilidad asociada a la enfermedad **(29)**.
- Prevención terciaria:
La prevención terciaria comprende el uso de la vacuna EG95 para evitar la hidatidosis en ovejas **(30)** que no es obligatoria en nuestro país como lo es en Chile y Australia.

5.3.5 Interrupción del ciclo de transmisión

Debido a que el *E. granulosus* tiene un ciclo de vida que involucra diversos actores, como perros, ganado, humanos e incluso el medio ambiente, se ha desarrollado estrategias para lograr la interrupción del ciclo de transmisión de la enfermedad que se constituyen en:

- Desparasitación de los perros:
El fármaco de elección es praziquantel a dosis de 5 mg/ kg en una dosis única, administrado cada 30 a 45 días en zonas hiperendémicas y cada 6 meses en zonas endémicas, de ser necesario puede enmascararse el sabor del fármaco con carne o paté. Cuando se administra de la forma correcta tiene una alta eficacia en la eliminación del parásito del organismo del perro, debido a ser una droga tenicida, sin embargo, al no ser un compuesto ovicida, puede favorecer a la contaminación del medio ambiente con huevos fértiles que pueden diseminarse, por lo tanto, es necesario tener un cuidadoso manejo de las heces para evitar la contaminación **(29)**.
- Inmunización de ovinos:
El desarrollo de la vacuna EG95 por la Universidad de Melbourne y su posterior evaluación experimental por el AgResearch de Nueva Zelandia y el programa de control de la Hidatidosis en Chubut, Argentina, ha brindado una herramienta de prevención de la propagación del ciclo del parásito. La vacuna desarrollada por ingeniería genética está basada en un clonado de antígeno de recombinante obtenidos a partir de huevos de *E. granulosus*. Es administrada por vía subcutánea a dosis d 50 µg de proteína junto con 1 mg de adyuvante Quil A, en

un volumen de 2 mL. En estudios experimentales, se ha obtenido una efectividad mayor a 82 % con una sólo dosis, con dos dosis 97 % de efectividad y hasta 100 % con tres dosis **(30)**.

- El mejoramiento de los establecimientos donde se faenan animales, los cuales deben evitar el acceso a los perros y tener un buen manejo de eliminación de vísceras y el control de las poblaciones caninas en áreas endémicas que permiten identificar las responsabilidades de los dueños de perros, son también medidas que contribuyen a la interrupción del ciclo de transmisión de la hidatidosis **(31)**.

5.4 Bisfosfonatos

5.4.1 Generalidades

Los BF fueron sintetizados, en Alemania, en el siglo XIX para ser utilizados, en la industria química, como agentes inhibidores de formación de depósito de carbonato de calcio en chimeneas, ablandadores de agua, agentes anticorrosivos y antisarro. **(32)**

En la década del sesenta, Neuman y Fleisch hallaron, in vitro, que el plasma y la orina contenían una sustancia que inhibía la precipitación de hidroxapatita; esta sustancia, era inactivada por la enzima fosfatasa alcalina por lo que se concluyó que este inhibidor de la precipitación de hidroxapatita era un polifosfato. **(32)**

En estudios posteriores, Fleisch aisló el pirofosfato inorgánico endógeno (PPi) de plasma y orina y observó, en estudios in vivo, que el PPi era capaz de bloquear la mineralización de hidroxapatita previniendo la calcificación de tejidos blandos. La efectividad del PPi sólo era observada cuando era administrado de forma parenteral, pues era hidrolizado por las pirofosfatasas que se encontraban en el trato gastrointestinal, cuando se administraba por vía oral. **(32) (33)**

En consecuencia, en el siglo XX, se sintetizan compuestos análogos del PPi endógeno, resistentes a la hidrólisis química y enzimática con la capacidad de inhibir la mineralización de hidroxapatita y regular la calcificación. **(32)**

A partir de 1970, se empieza a utilizar a los BF con aplicación clínica en el tratamiento de la enfermedad de Paget y posteriormente en el tratamiento de la osteoporosis, en 1990. **(34)**

Actualmente, los BF son un conjunto de fármacos autorizados para el tratamiento de múltiples patologías óseas como la osteoporosis, la enfermedad de Paget o la osteólisis asociada al cáncer de mama o mieloma múltiple, entre otras. **(35)**

Los BF son compuestos estables que resultan de la sustitución del oxígeno que une al doble grupo fosfónico, por un grupo metilo, en la estructura del PPi (Figura 4). Esta sustitución permite la unión de radicales al átomo de carbono y los cambios en la estructura base de los BF, resultan en compuestos con propiedades fisicoquímicas, farmacodinámicas y farmacoterapéuticas diversas, dando origen a las diferentes generaciones de BF. **(35) (36)**

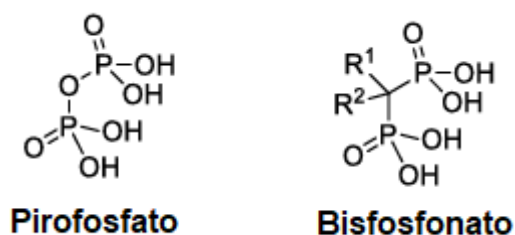


Figura 4: Comparación entre la estructura del PPi endógeno y la estructura química de los BF.

5.4.2 Mecanismos de acción

Los BF actúan inhibiendo la capacidad reabsortiva de los osteoclastos por los siguientes mecanismos: promoviendo cambios en su estructura y estimulando la apoptosis de los osteoclastos. En el proceso de resorción ósea, la hidroxiapatita se disuelve por la acidificación del espacio subcelular promovida por las bombas de protones ubicadas en las membranas de los osteoclastos (33). Debido al cambio de pH producido en la resorción ósea por la actividad de los osteoclastos los BF, al ser altamente afines a la hidroxiapatita que se encuentra expuesta, salen rápidamente del torrente sanguíneo y son absorbidos por el hueso, luego son captados por los osteoclastos e internalizados por pinocitosis y/o fagocitosis, lo que resulta en una modificación del citoesqueleto de la célula, desapareciendo el anillo de actina necesario para la formación del borde en cepillo del osteoclasto y por lo tanto, la pérdida de su capacidad de adherirse a la superficie ósea y realizar la resorción (36) (37).

Las diferentes modificaciones en los radicales de la estructura química de los BF dan lugar a variaciones en la potencia, eficacia y el mecanismo acción. Sin embargo, todos ellos modifican a los osteoclastos y favorecen su apoptosis.

Se los divide en BF nitrogenados y no nitrogenados teniendo mecanismos de acción moleculares distintos.

5.4.2.1 Bisfosfonatos no Nitrogenados (nNBF)

Los nNBF son fármacos de primera generación, caracterizados por no poseer un Nitrógeno en los radicales unidos al grupo metileno en la base de la estructura de los BF, actúan como pro-fármacos, activándose una vez que intervienen en el metabolismo de los osteoclastos (36).

Los fármacos que integran este grupo son clodronato, tiludronato y etidronato (EHDP) (Figura 5.a) y son utilizados en el metabolismo del osteoclasto para luego dar lugar a análogos citotóxicos del adenosín trifosfato (ATP). Intervienen en la acción de las enzimas aminoacil-ARNt sintetasas que favorecen la condensación de ATP y un aminoácido con liberación de PPi, en una reacción reversible. El BF, al ser análogo del PPi, los reemplaza en los grupos fosfato β y γ del ATP formando metabolitos AppCp, no hidrolizables. (Figura 5.b) La acumulación, de estos metabolitos no hidrolizables en el citoplasma, causa la apoptosis de los osteoclastos. Los BF nitrogenados no tienen este mecanismo de acción debido a que por su estructura química no se pueden unir al ATP (33) (37).

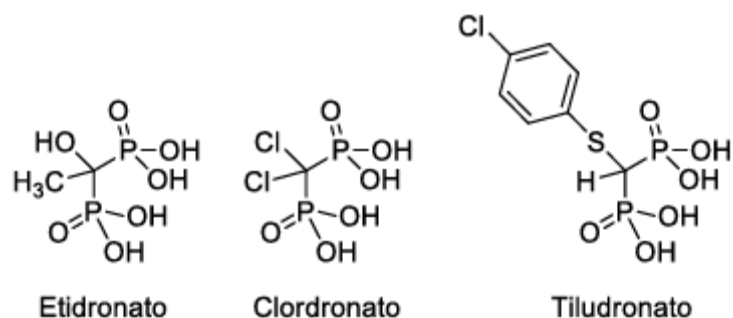


Figura 5.a: Estructura química de los BF no nitrogenados. (Modificado de Ferrer Casal, 2017) (33)

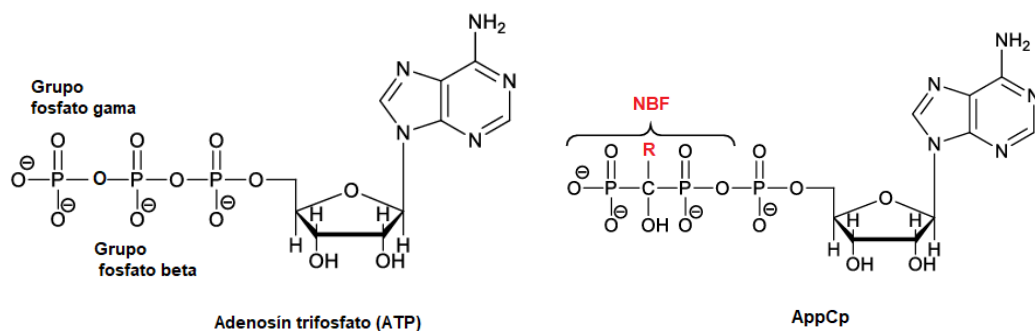


Figura 5.b: Comparación entre la estructura química del metabolito citotóxico AppCp y ATP. (Modificado de: Ferrer Casal, 2017) (33)

La formación de metabolitos citotóxicos no hidrolizables sólo es posible con clodronato y EHDP debido a que poseen cadenas laterales cortas. Tiludronato no es capaz de unirse al ATP debido a la presencia de anillos aromáticos en su estructura (33) (37).

5.4.2.2 Bisfosfonatos nitrogenados (NBF)

Los NBF tienen una capacidad antirresortiva más potente que los BF de primera generación, este grupo de fármacos se compone por pamidronato, alendronato, neridronato, olpadronato (OPD), ibandronato (IB), risedronato (RIS) y ácido zoledrónico (AZ) (Figura 6) (33).

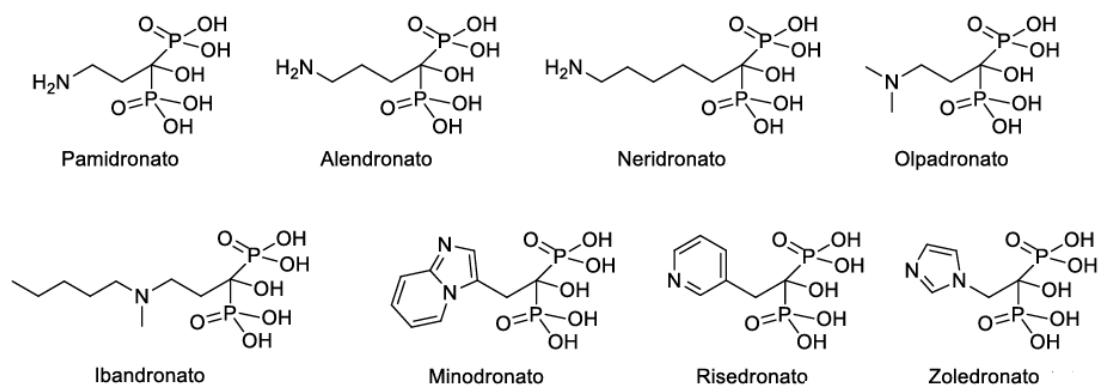


Figura 6. Estructuras químicas de los NBF, risedronato y ácido zoledrónico son 10000 veces más potentes que los nNBF debido a la presencia de nitrógeno dentro de un anillo aromático. (Modificado de: Ferrer Casal, 2017) (33)

El mecanismo de acción de los NBF se ejerce sobre la vía del mevalonato al inhibir a la farnesilpirofosfato sintasa (FPPS) y la Solanesil difosfato sintasa, interfiriendo en el proceso de producción del colesterol, y de los metabolitos como farnesildifosfato (FPP) y geranilgeranildifosfato (GGPP), necesarios para la prenilación de proteínas pequeñas como GTPasas, tipo Ras, Rho y Rac. (Figura 7) (37).

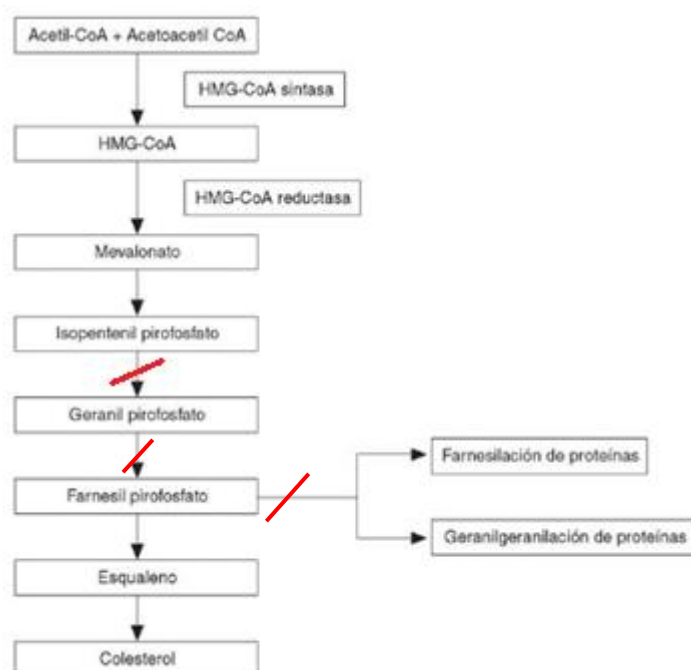


Figura 7: Representación del sitio de inhibición de los NBF en la vía del mevalonato. (Modificado de: Hawkins Carranza, 2000) (37)

La inhibición de la prenilación de moléculas pequeñas GTPasas desfavorece las interacciones proteína-proteína, el anclaje y el transporte de las moléculas pequeñas y su llegada los lugares de acción, afectando la formación del citoesqueleto de los osteoclastos promoviendo su apoptosis (37).

De todos los NBF presentados el ácido zoledrónico, se constituye como el más potente inhibidor de la reabsorción ósea (38).

5.4.3 Farmacocinética de los bisfosfonatos

Los BF pueden ser administrados por vía oral (VO) o endovenosa (EV).

La absorción intestinal de los BF es baja, 1 - 2 % para el EHDP, por ejemplo, y disminuye con la ingesta de alimentos, por lo que deben ser tomados en ayunas. Debido a su alta polaridad, su biodisponibilidad es baja por VO siendo 0.7 % para los NBF y 2 - 2.5 % para los nNBF (39) (40).

Los BF pueden causar algunos efectos tóxicos sobre el tracto gastrointestinal mayoritariamente a nivel del esófago, siendo una recomendación constante a la hora de la administración oral del medicamento, que el paciente no se recueste al menos durante 30 minutos, después de ingerir el fármaco.

Se ha reportado un amplio rango de unión de los BF a proteínas plasmáticas que va desde 5 % a 90 % dependiendo del BF y su concentración.

La afinidad de los BF con por la hidroxapatita también es variable, siendo proporcionalmente inversa a la capacidad del BF a penetrar el hueso a profundidad. Un ejemplo de esto sería el RIS que tiene una alta capacidad de llegar a la red canalicular ósea y acceder a los osteocitos, debido a su débil unión con la hidroxapatita. Esta característica explica la mayor potencia antirresortiva del RIS, frente a otros BF como el alendronato que es 45 veces menos efectivo para inhibir la función de los osteoclastos. Debido a la acumulación de los BF en las capas óseas el rango de tiempo de vida media de estos fármacos es de 1 a 10 años (41) (42).

Los BF se excretan por los riñones a través de filtración glomerular, por lo que ningún BF está aprobado para su uso en pacientes con un aclaramiento de creatinina menor a 35 mL / min. Estos compuestos pueden ser detectados en orina después de años de finalizado el tratamiento (41) (43).

5.4.4 Efectos adversos

Los BF tienen un perfil de seguridad satisfactorio evidenciado en diferentes ensayos clínicos para su aprobación comercial, por lo general, son bien tolerados y sus efectos adversos más comunes están asociados a sus formas farmacéuticas orales (44) .

Se ha observado efectos leves sobre la mucosa gastroesofágica como irritación, vómitos o dispepsia, eventos que pueden ser evitados al tomar el medicamento bajo las medidas preventivas adecuadas, como no recostarse hasta transcurridos 30 minutos después de la toma del BF acompañado con 250 mL de agua. Existe, también, una baja incidencia de erosiones esofágicas o úlceras gastroduodenales, por lo que, se debe evaluar el riesgo beneficio en el uso en pacientes con historial de enfermedades del tracto gastrointestinal superior (44) (45).

Otros efectos adversos con incidencias muy bajas son:

- Oculares: Conjuntivitis inespecífica de intensidad leve que suele ceder sin tratamiento y Uveitis, donde debe realizarse la suspensión del tratamiento con BF (45).

- Toxicidad renal: La mayor parte de los casos observados fueron en pacientes con disminución de la función renal previa con un aclaramiento de creatinina menos a 30 mL / min y tratados con BF intravenosos **(41) (45)**.
- Respuesta de fase agua: Producida en pacientes a los que se les administran NBF por primera vez. Se caracteriza por un cuadro temporal de fiebre y mialgia **(44)**.
- Osteonecrosis maxilar: Relacionados a pacientes con procedimientos invasivos en la mandíbula, infecciones dentales o historial de cáncer. Se han reportado casos aislados en tratamientos con BF orales e intravenosos **(46)**.
- Fracturas atípicas en la diáfisis femoral: Se presentan tratamientos prolongados en pacientes mayores a 60 años, con una incidencia de 7,8 por 100 000 personas. Se caracteriza por la aparición de dolor en los muslos previo a la fractura, lo que sugiere una baja capacidad de recambio óseo **(44)**.

5.4.5 Bisfosfonatos como antiparasitarios

En el año 1995, se identificó la presencia de una vacuola ácida cuya almacenadora de calcio en *Trypanosoma Cruzi*, (*T.cruzi*) un parásito protozoario causante de la enfermedad de Chagas. Se determinó que esta organela, llamada acidocalcisoloma, está encargada del depósito de calcio intracelular en el parásito, además de confirmar la presencia de un sistema de intercambio de intracelular de calcio y protones, lo cual, la hace de importancia quimioterapéutica **(47)**.

En 1999, estudios revelaron que el PPI es más abundante que el ATP en *T.cruzi* y 23 % del PPI se localiza en los acidocalcisolomas, además de ser parte esencial en el metabolismo de enzimas de los tripanosomátidos. En este estudio también se comprobó que los BF inhiben la proliferación de amastigotes de *T.cruzi*, y detienen la parasitemia en ratones **(48)**.

Se observaron los efectos de los BF en estudios en *E. granulosus*, donde se comprobó la disminución en el crecimiento de las células de este parásito tratadas con BF, además, del aumento del almacenamiento de calcio, comparados con un tratamiento de prolina que, al reducir el depósito de calcio, aumentó el crecimiento de las células. La reducción del crecimiento celular no se observó en células mamíferas tratadas con BF. Estos estudios apoyan el concepto del impacto de los BF en el tratamiento de las infecciones por *Cestodes*. **(49) (50)**

5.4.6 Utilización de los bisfosfonatos en medicina veterinaria

Debido a la eficacia conocida de los BF en el alivio del dolor causado por enfermedades óseas, en humanos, es cada vez más común el uso de estos fármacos en perros con tumores primarios en los huesos como osteosarcoma, observándose el aumento de la densidad ósea en un 18% **(42) (51)**.

Los BF más utilizados en medicina veterinaria son pamidronato y ácido zoledrónico, siendo administrados por infusión intravenosa. Este tipo de administración es bien tolerada por los perros y mantiene el efecto analgésico de la droga por al menos cuatro meses. A dosis de 1 - 2 mg / kg, el pamidronato presenta un control del dolor de hasta 50 % de pacientes con una duración de 2 a 3 meses, sobre todo si se usa en combinación con (antiinflamatorios no esteroideos) AINES **(52)**.

El AZ a dosis de 0,1 mg/kg como agente único de tratamiento, mostró una respuesta de reducción del dolor en el 50 % de los perros tratados. También se sugiere su efecto

anticancerígeno, debido a que redujo la proliferación de células de osteosarcoma apendicular canino, sin embargo, este uso para los BF se sigue estudiando (53).

Por otro lado, la administración oral de BF, es menos aconsejada porque puede causar irritación esofágica, debido a la posición horizontal del esófago de los perros y porque la biodisponibilidad por esta vía es menor, sin embargo, el alendronato es el BF de elección para administración VO con una dosis de 10 mg / perro (42).

Los efectos adversos de los BF son en uso en animales son poco comunes, pero se ha descrito casos muy raros de fracturas y ulceración mandibular en perros tratados con ácido zoledrónico y pamidronato, por un periodo de tiempo de más de 8 meses. También, existen algunos reportes de hipercalcemia que sería un evento raro pero asociado al uso de BF en gatos (42).

5.5 Ivermectina

5.5.1 Generalidades

La ivermectina (IV) es una lactona macrocíclica, usada en medicina veterinaria y humana, como antiparasitario de amplio espectro, debido a su actividad contra nematodos y artrópodos (54) .

La IV es un derivado de las avermectinas son compuestos purificados de bacterias gram positivas, *Streptomyces avermitilis*. Este descubrimiento se adjudica al microbiólogo Satoshi Omura, que en 1970 probó su efecto antiparasitario en *Heligomosoides polygyrus*, un nematodo que infecta a ratones (55) .

En el año 1981 la IV fue introducida al mercado médico-veterinario por Merck & Co. posicionándose como uno de los más importantes antihelmínticos, incluso por sobre macrolactonas, posteriormente desarrolladas, como moxidectina y milbemicina.

En perros, se usan formulaciones junto a pirantel, febendazol o albendazol por su gran eficacia antiparasitaria, además de su seguridad (55).

En humanos, la IV se usa para tratar strongiloidiasis, sarna, pediculosis, gnatostomiasis, miasis y leishmaniasis (56).

En estudios del efecto de la IV sobre *E. granulosus*, se ha observado efectos escolicidas y tasas importantes de apoptosis de protoescolices del parásito. El mecanismo de acción no se ha determinado del todo, pero se observó la activación de caspasas 1 y 3 que conducirían a la apoptosis (57).

5.5.2 Mecanismo de acción

La IV actúa, principalmente, en la activación de canales de cloro mediados por glutamato (GluCl) que se localizan en las células musculares de los parásitos, produciendo la hiperpolarización de la placa neuromuscular causando la muerte del parásito. Su efecto es más efectivo en las etapas larvarias de los parásitos (58) .

La IV abre selectivamente los GluCl que se encuentran en los nervios motores, tractos reproductivos, músculos faríngeos y poros secretores/excretores de los parásitos e insectos.

La estructura de los canales GluCl se componen de un anillo de cinco subunidades proteicas, cada subunidad cuenta con 500 aminoácidos estructurados en cuatro hélices alfa transmembrana, las cuales, pueden ser homogéneas o heterogéneas. En los GluCl se encuentran sitios de unión ortostéricos y alostéricos. El glutamato se une a los sitios ortostéricos y la IV a los alostéricos localizándose en la membrana externa de la bicapa de fosfolípidos. Debido a su naturaleza lipofílica, la IV hace contacto con la hélice alfa del canal, manteniéndolo abierto favoreciendo hiperpolarización de la membrana (59).

Los poros excretores responsables de la liberación de los factores inmunomoduladores parasitario son controlados por GluCl, es así como la IV también actuaría como un factor inmunomodulador indirecto sobre la respuesta antiparasitaria del hospedador permitiéndole activar sus células mononucleares y neutrófilos (59).

Entre otras acciones de la IV, está la de interferir sobre los canales de Cl⁻ / GABA interfiriendo en la absorción parasitaria de nutrientes y causando parálisis muscular y asfixia por su acción sobre los canales de glutamato de calcio regulados por GABA, de ubicación muscular en los nematodos. Estos canales (GABA -Ca²⁺ Glu) no existen en el mamífero, logrando de esa forma, una acción selectiva antiparasitaria (60).

5.5.3 Efectos adversos

La IV cuenta con un rango de seguridad amplio y es bien tolerada en su uso en medicina humana y veterinaria, generalmente los efectos adversos causando por IV son raros y leves. Su uso no se recomienda en pacientes pediátricos con menos de 15 kg o menores de 2 años, sin embargo, los estudios sobre la seguridad de la IV en niños muestran que es similar a la de los adultos (60).

Algunos de sus efectos adversos son prurito, edema, cefaleas, artralgias y mialgias, muchos de estos asociados a filariasis, pues el paciente puede desarrollar un proceso alérgico a las filarias destruidas (60) (61).

En pacientes tratados infectados con oncocercosis, se pueden presentar conjuntivitis, edema palpebral o queratitis y casos aislados de encefalopatías en pacientes que tenían altos niveles de coinfección con *Loa loa* (61).

5.6 Modelo celular *Echinococcus granulosus* protoescólices (línea celular EGPE)

El desarrollo de la línea celular EGPE surgió por la necesidad de proporcionar una herramienta para el estudio fisiológico y farmacológico en hidatidosis.

Las células EGPE fueron obtenidas, por digestión enzimática, desde protoescólices de *E. granulosus* G1, aislados de un quiste parasitario ubicado en el hígado de un bovino. Fueron mantenidas por 3 años en cultivo, luego congeladas y resembradas, manteniendo su estabilidad. Se caracterizaron por técnicas de histología, microscopía electrónica, la expresión del antígeno B4 por inmunofluorescencia y PCR para COX1.

Estas células tienen la capacidad de formar colonias quísticas en cultivo bifásico con agarosa, imitando la formación del metacestode. Debido a esto, constituyen un sistema importante para los estudios farmacológicos preclínicos en la búsqueda de tratamientos para la hidatidosis (62).

Las células EGPE también se utilizan para el estudio del mejoramiento del diagnóstico serológico de la hidatidosis, usando dos estadios de crecimiento celular como fuentes de antígenos de *E. granulosus* para investigar su sensibilidad y especificidad en pruebas serológicas como western blot (WB) y ELISA, en reacción con suero de pacientes con hidatidosis. (63) Varios estudios realizados con BF sobre estas células demostraron una probable actividad de algunos de estos compuestos sobre el crecimiento celular y sobre la dinámica del calcio total y del calcio iónico (49) (50).

6. HIPÓTESIS

El tratamiento con BF, como monodroga, o en combinación con IV, tiene efectos inhibitorios de la proliferación de células EGPE, provenientes de protoescólices de *E. granulosus* y tiene efectos antiparasitarios ovicidas sobre las proglótides en *T. hydatigena* y *E. granulosus*, pudiendo representar una alternativa para evitar la propagación de la hidatidosis.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo principal

Determinar el efecto antiproliferativo de los BF como agentes únicos de tratamiento o en combinación de IV en células EGPE provenientes de protoescolices de *E. granulosus* y correlacionar su efecto antiproliferativo con el efecto ovicida ex vivo en proglótides de *T. hydatigena* y *E. granulosus*, obtenidos de perros infectados naturalmente.

7.2 Objetivos secundarios

- Determinar la concentración inhibitoria 50 (CI50) de la IV sobre las células EGPE.
- Determinar los BF con mayor efecto antiproliferativo sobre las células EGPE.
- Determinar el efecto de la combinación IV y BF sobre la proliferación de las células EGPE.
- Determinar cuáles de los BF ensayados en los puntos anteriores y su combinación con la IV, tienen mayor efecto ovicida sobre la proglótide de *T. hydatigena* y *E. granulosus*.
- Escalar los resultados experimentales a la investigación clínica farmacológica.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Materiales

8.1.1 Cultivo celular

- EGPE en medio 199 (Sigma-Aldrich, lote RNBF1535)
- Suero Fetal bovino descomplementarizado grado biología molecular (SFB) 10% (Internegocios, lote 005)
- Agarosa grado molecular

8.1.2 Reactivos

- Antibióticos Penicilina/Streptomycin (Sigma-Aldrich lote 065M4794V). Stock de 5000 unidades de penicilina y 5 mg de estreptomycin.
- β -mercaptoetanol (MP Biomedicals MR 29303)
- DMSO (Sigma, lote 472301)
- Azul de tripán (Sigma, Cód. T6146-5G)
- Reactivo de Bradford (Bio Rad lote L9700067)
- Ácido pirúvico (Anedra Cod. 6134)
- Glutamina (Sigma-Aldrich, lote RNBC8866)
- PBS (buffer) (HyClone lote AVA57593B)
- Bicarbonato de sodio sobresaturado (Anedra lote Nro 12128-2)
- HEPES 10 mM (MP Biomedicals lote 7847H)
- Agua para inyectable.
- Etanol
- BF: Etidronato de sodio, ácido zoledrónico, risedronato (Laboratorios Gador).
- Ivermectina mezcla racémica.

8.1.3 Plásticos y otros

- Placa de fluorescencia de 96 pocillos (Corning)
- Tubos Eppendorf de 1,5 mL (BD)
- Tubos Falcon de 15 mL (BD)
- Tubos de 50 mL
- Micropipetas p10, p100 y p1000 (Eppendorf)
- Placas de 6 pocillos cultivo (BD)
- Placas de 24 pocillos cultivo (BD)
- Cámara de Newbauer
- Crioviales (BD)
- Filtros de poro de 22 micras de diámetro (BD) estériles.
- Cubetas de medición de absorbancia
- Tips azules (100-1000 microlitros) ExtraGene.
- Tips amarillos (Biologix)
- Cucharas de metal.

8.1.4 Equipos

- Flujo laminar (LABTEC, modelo SW-JC-1FD)
- Phimetro (Adwa)
- Espectrofluorometro GloMax-Multidetecction system (Promega)
- Centrífuga (Rolco Modelo 2036 y Ecys para tubos Falcon)
- Microscopio Óptico invertido (Arcano)
- Microscopio de fluorescencia (Arcano, modelo: xsz-107e)
- Estufa de cultivo húmeda/ gaseada (Sanyo)
- Balanza digital (Ohaus, d=0,1mg)
- Vortex
- Microondas

8.2 Estudio in vitro

Se realizó en una línea celular provenientes de protescólices de *E. granulosus* (EGPE), con capacidad formadora de colonias quísticas (62).

8.2.1 Preparación del medio de cultivo

Para la preparación de 50 mL de medio de cultivo, se diluyó 4,5 mL de medio M199 (10X), en 40,5 mL de agua estéril, logrando una concentración de 1X, se añadió 250 µL de penicilina/estreptomicina, 250 µL de solución estéril de piruvato 200 mM (0.88 g en 40 mL de agua destilada), 550 mL de β-mercaptoetanol 0,2 M y 5 mL de Suero Fetal Bovino (SFB) inactivado por calor, posteriormente, el medio preparado fue llevado a pH 7,4 con una solución sobresaturada de bicarbonato de sodio (NaHCO₃).

8.2.2 Descongelamiento

El procedimiento de descongelamiento de las células se realizó sumergiendo por completo el criovial en agua caliente, dentro de un recipiente metálico con tapa, se limpió el criovial con etanol 70°. Dentro de flujo laminar, el contenido fue transferido a un tubo Falcon de 15 mL al cual se agregó 5 mL de medio completo y se sembró 1 mL en cada pocillo de la placa, agregando luego 3 mL de medio completo a cada uno.

8.2.3 Mantenimiento y repique celular

Las células EGPE fueron sembradas en placas de 6 pocillos con 4 mL de medio completo M199 por pocillo e incubadas en una estufa gaseada con 5% de CO₂ a 37°C. El cambio de medio se realizó cada 7 días. Las células fueron repicadas mensualmente, el repique se realizó de la siguiente forma: se aspiraron las células y el medio que se colocó en tubos Falcon de 15 mL, se centrifugaron a 4000 rpm durante 3 minutos, se descartó el sobrenadante y los pellets fueron reconstituidos con 6 mL de medio completo, se sembró 1 mL de la suspensión celular en cada pocillo y agregó 3 mL de medio a cada uno.

8.2.4 Congelamiento

Las células fueron congeladas después de dos semanas desde su descongelamiento, observadas previamente en el microscopio invertido para comprobar su buen estado. Para este procedimiento, las células fueron centrifugadas a 4000 RPM durante 3 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido fue reconstituido con 1,5 mL de una solución estéril de dimetilsulfóxido (DMSO) y SBF (10 % y 90 %, respectivamente), el contenido se pasó a un criovial que fue llevado a un tanque de nitrógeno líquido, para su congelamiento.

8.2.5 Curva de crecimiento celular

Para conocer el comportamiento de las células respecto a su crecimiento, se realizó una curva de crecimiento con tres diferentes concentraciones iniciales de células por pocillo: 10^5 , 10^4 y 10^3 en 0,2 mL de volumen final por pocillo. La curva de crecimiento se realizó por triplicado en 2 places de 96 pocillos, una para contero de células y otra para concentración de proteínas. Se cuantificó el crecimiento celular cada 24 horas, durante 6 días. (puesta a punto cultivo celular, los resultados no se muestran)

8.2.6 Conteo celular

Las células fueron centrifugadas, el pellet obtenido fue reconstituido con 1 mL de Buffer fosfato salino (PBS) y centrifugado nuevamente, se descartó el sobrenadante, se reconstituyó el nuevo pellet con 3 mL de medio completo.

En un tubo eppendorf, se mezclaron 10 μ L de azul de tripán y 10 μ L del suspendido celular, este contenido se cargó en una cámara de Neubauer, que se observó en el microscopio invertido. Las células fueron contadas usando el cuadrante central de la cámara debido a su tamaño, a su vez, se consideraron cinco cuadrados interiores del mismo, sacando un promedio del número de células de los cinco. Los cálculos del número celular por mililitro se obtuvieron de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$N^{\circ} \text{ de células/mL} = \sum \cdot Fd \cdot (5 \cdot 10)^4$$

Donde: $\sum$: sumatoria del número de células de los cinco cuadrantes.

Fd: Factor de dilución.

Fórmula N°1: Cálculo número de células en cámara de Neübauer

8.2.7 Colonias quísticas en agarosa

8.2.7.1 Preparación de los BF

Para la preparación de las soluciones madre (BF) con una concentración de 10 mM, se pesaron, en una balanza analítica, distintas cantidades de BF, de acuerdo con su peso molecular como se muestra en la tabla N°6, las cantidades pesadas se colocaron en tubos Falcon a los que se les añadió 2 mL de PBS y se llevaron a agitación por vórtex hasta la completa disolución del polvo.

A partir de cada solución madre se hizo una dilución a concentración de 1 mM, colocando en un tubo 200 μ L de cada solución madre y añadiendo PBS hasta el volumen de 2 mL.

Estas soluciones se almacenaron a temperaturas de 2 entre 2°C a 8°C, para su conservación.

Bisfosfonatos	Peso molecular (g/mol)	Cantidad pesada (g)
Aminoetidronato de sodio (EHDP)	249,85	0,0049
Risedronato de sodio (RIS)	298,77	0,0060
Ácido Zoledrónico (AZ)	291,92	0.0054

Tabla N°6: Cantidad pesada de BF para la solución madre de concentración 10 mM.

8.2.8 Formación y tratamiento de las colonias de EGPE

8.2.8.1 Obtención de colonias quísticas de EGPE

En un tubo Falcon de 10 mL se agregó 0,04 g de agarosa, a los que se añadió 2 mL del buffer (2 % de concentración final); la mezcla se calentó hasta la total disolución de la agarosa. Se sembraron 500 µL de agarosa disuelta en cada pocillo, cuando el gel llegó a 37°C se sembró 10 µL de la suspensión celular, agitando, para la buena distribución de las células. Una vez, solidificado, se agregó 500 µL de medio completo.

La cantidad de células utilizadas para el ensayo fue de 1000 células contenidas en 10 µL, por pocillo, por lo cual, se preparó una suspensión celular con estas características.

8.2.8.2 Obtención de la Concentración Inhibitoria 50 (IC50) de ivermectina sobre células EGPE

La IC50 de los BF (30 µM) fue determinada y publicada (Fuchs y col 2012) **(49)**.

La IC50 de la IV se determinó tratando las colonias de células EGPE a diferentes concentraciones: 1; 3; 10 y 30 µM. Se analizó por triplicado cada concentración y el control y se contaron 10 campos por cada pocillo; se obtuvo el promedio de la cantidad de colonias por pocillo y el desvío estándar. La ivermectina es poco soluble en agua, por lo que se preparó 3 mL de solución madre 200 µM, para la cual se pesó 0,0005 g de IV que se disolvieron en 310 µL de etanol 96°, con agitación en vórtex, una vez homogénea la solución se añadió 2690 µL de PBS estéril y se agitó nuevamente. El grupo testigo se trató con el solvente de la IV, una solución de 10% de etanol en PBS. Las colonias celulares de EGPE se obtuvieron y se trataron como se describe más adelante

8.2.8.3 Tratamiento de las colonias de EGPE con bisfosfonatos

Se trabajó por triplicado en cada tratamiento que se realizan en las colonias celulares sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos. Los grupos de tratamiento fueron: Blanco, Testigo, EHDP (sal de sodio para tratamiento oral), RIS (sal de sodio para tratamiento oral) y AZ (tratamiento endovenoso).

Para el blanco se incubaron las colonias con una solución filtrada por poro 0,22 µm de buffer HEPES 5mM y buffer fosfato 5 mM. Para el buffer fosfato se prepararon dos soluciones de fosfato de sodio y fosfato de potasio, ambas de 2,5 mM, las cuales se

mezclaron para obtener la solución buffer de 5 mM. Se mezclaron cantidades iguales de ambas soluciones finales, consiguiendo la solución buffer blanco de trabajo.

El tratamiento de las colonias celulares se realizó mezclando en un tubo 0,04 g de agarosa, 1940 µL de buffer y 60 µL de una solución de la solución de tratamiento donde la concentración final de la droga es de 30 µM (BF), concentración inicial 1 M en PBS-buffer fosfato). El grupo blanco se realizó agregando el mismo volumen de PBS en la agarosa (60µl). Una vez solidificado el gel, se agregó 500 µL de una solución 30 µM de BF o buffer fosfato / HEPES (blanco) o PBS (testigo) con medio completo, dilución final de medio de cultivo 11 %.

La placa se incubó durante 5 días, en una estufa a 37 °C con 5 % de CO₂, a los 5 días las placas eran retiradas y observadas por microscopía de luz transmitida en microscopio invertido aumento 400x y se fotografiaban 10 campos de cada pocillo, para luego evaluar el número de colonias formadas, su tamaño de la colonias y celularidad.

8.2.8.4 Tratamiento con ivermectina y su combinación con bisfosfonatos

Se procedió a tratar las células con combinaciones de IV+BF, para este experimento se utilizaron 8 grupos de tratamiento experimental: Blanco, Testigo, EHDP, RIS, AZ, combinación IV + EHDP, IV + RIS e IV + AZ; las concentraciones usadas para los BF fueron de 30 µM y para la IV 20 µM.

Estos ensayos se evaluaron por microscopía óptica aumento 400 x en microscopio invertido se cuantificó el número de colonias, el tamaño de colonias y su celularidad.

8.3 Estudio ex vivo

8.3.1 Obtención de muestras y tratamiento con bisfosfonatos e ivermectina

Las proglótides se obtuvieron del tratamiento de perros naturalmente infectados y desparasitados con bromhidrato de arecolina en catastros realizados en el partido de General Belgrano, Provincia de Chubut, por el Dr. Oscar Jensen y la Dra. Laura Gertiser (equipo de Control de Hidatidosis del departamento de Zoonosis de Chubut).

En un primer ensayo, las progótides de *T. hydatigena*, y las tenias de *E. granulosus*, fueron lavadas y tratadas con BF en una suspensión de materia fecal 50 % con PBS e incubadas durante 3 días.

Pasado el periodo de incubación, los ejemplares fueron separados en dos grupos, uno para su análisis histológico y el otro grupo, para el análisis de viabilidad de las oncosferas contenidas en las proglótides.

En el segundo ensayo, se obtuvieron tenias de *E. granulosus* que fueron incubadas en medio nutritivo, en lugar de la materia fecal, al no haberse podido evaluar la viabilidad de las oncosferas de este parásito en el primer ensayo, debido a que no se encontraron oncosferas dentro de las proglótides del grupo control.

Los tratamientos utilizados para *T. hydatigena* fueron: olpadronato (ODP), ibandronato (IB), AZ, EHDP la combinación EHDP+ IV.

En *E. granulosus* se realizaron los tratamientos con AZ, IV y AZ + IV.

Las concentraciones de los tratamientos fueron: 1,5 % para los BF y 0,48 % para IV.

8.3.2 Análisis de viabilidad de las oncosferas

Las proglótides grávidas de *T. hydatigena* y las tenias de *E. granulosus*, se lavaron con solución fisiológica (SF) y se cortaron longitudinalmente con un bisturí para liberar las

oncosferas. El material obtenido fue lavado nuevamente con SF. La viabilidad fue evaluada por método de flotación TON (las oncosferas que flotaban se las considera no viables) y por exclusión con colorante azul de tripán al 0,1 %. Tomando como oncosferas viables (OV) aquellas no coloreadas con azul y oncosferas no viables (ONV) las teñidas.

8.3.3 Análisis histológico e histoquímico

Se realizaron cortes histológicos, de aproximadamente 10 µm de espesor, de las proglótides de *T. hydatigena* y *E. granulosus*, las cuales fueron teñidas con hematoxilina-eosina, para la evaluación mediante microscopía óptica de las oncosferas maduras e inmaduras. Se evaluaron 400 campos por tratamiento (aumento 400 x).

Para el análisis histoquímico se evaluó el depósito de calcio en los huevos, para lo cual, se utilizó la tinción específica para identificación de calcio, de Von Kossa. Se distinguió la localización del calcio intraembrionario para cada tratamiento, considerando esta localización como distrófica en el embrión poco viable.

8.4 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos se usó la prueba de la varianza para más de dos grupos, ANOVA de una vía, prueba post hoc Tuckey, y la prueba de χ^2 ; en la herramienta de análisis estadístico GraphPad Prism 8.

El cálculo de la IC50, se llevó a cabo en GraphPad Prism 8.

9. RESULTADOS

9.1 Estudio in vitro

Para determinar el efecto de los BF e IV sobre las células EGPE se evaluó la cantidad y la densidad celular de colonias de EGPE.

9.1.1 Concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de la ivermectina

Fueron analizadas siguientes concentraciones de IV: 30, 10, 3 y 1 μ M.

La cantidad de colonias formadas fue desde $66 \pm 2,64$ (media $\pm$ SD) para 1 μ M hasta $24 \pm 7,57$ para 30 μ M. La estimación por métodos estadísticos dio como resultado una IC₅₀ de :20 μ M ($p < 0.001$) (Figura 7).

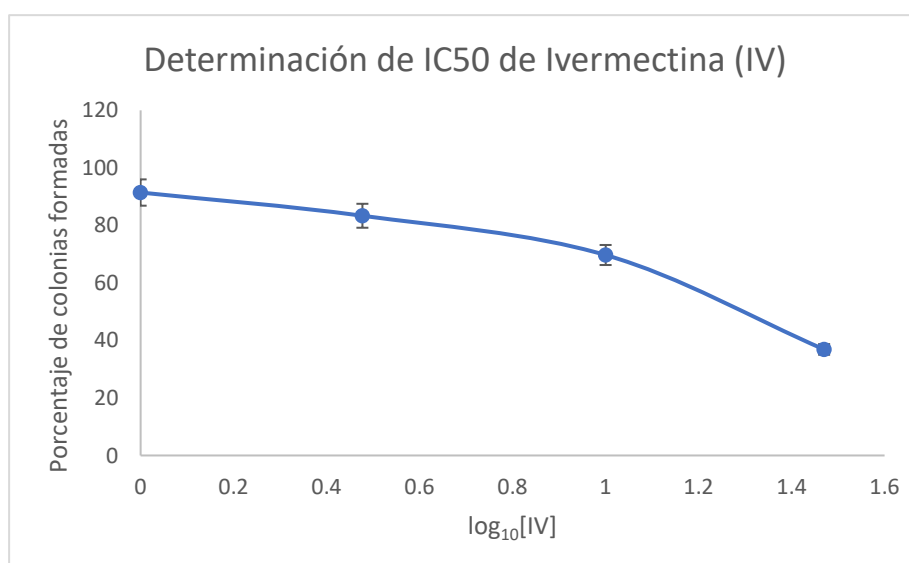


Figura 7. Gráfico dosis-respuesta de la IV sobre la formación de colonias de las células EGPE. En la abscisa se muestra el logaritmo de la dosis de IV y en la ordenada se graficó el porcentaje de colonias obtenidas por efecto de las diferentes concentraciones, siendo el 100 % el número de colonias obtenidas con el excipiente (alcohol 10 % en PBS).

9.1.2 Efecto del tratamiento con bisfosfonatos e ivermectina, como monodroga y en combinación sobre las colonias

9.1.2.1 Cantidad de colonias formadas

Los BF ensayados, EHDP, AZ, RIS con una concentración de 30 μ M disminuyen significativamente la formación de colonias de las células EGPE, respecto al testigo y control, y la IV fue significativamente más efectiva a 20 μ M que los BF ($p < 0,05$) (Figura 8). La combinación de la IV con los diferentes BF disminuyen la formación de colonias en forma significativa respecto al tratamiento con BF y solamente la combinación de RIS y AZ con IV, disminuye significativamente la formación de colonias respecto al tratamiento solo con IV (post hoc Tuckey) ($p < 0,05$)

Cantidad de colonias de EGPE en presencia de BF e IV

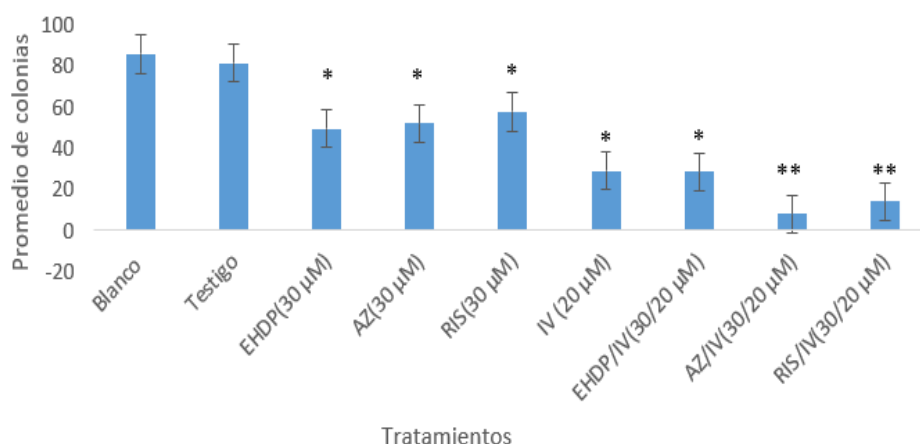


Figura 9. Promedio de colonias formadas por pocillo de EGPE tratadas con etidronato (EHDP), ácido zoledrónico (AZ), risedronato (RIS) con concentración de 30 µM, ivermectina (IV) 20 µM, y la combinación de ivermectina (IV) con los tres BF. * $p < 0,05$, evaluado por ANOVA de una vía, respecto a los grupos blanco y testigo. ** La combinación de AZ + IV mostró diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto a RIS + IV. Experimento realizado por triplicado y evaluación de 10 campos por pocillo.

9.1.2.2 Evaluación de la densidad celular de colonias de EGPE

La celularidad de las colonias formadas por células EGPE fue evaluada por microscopía óptica y se utilizó el χ^2 para su evaluación estadística. Se evaluó la proporción de colonias con alta densidad celular, en la Figura 10, A y B muestran las diferencias de densidad celular de las colonias. Esta evaluación no se pudo efectuar con la combinación de AZ + IV porque de 6 pocillos evaluados, 10 campos cada uno, solamente se encontraron dos colonias de alta densidad.

En este análisis, se observó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos tratados solamente con BF e IV respecto al grupo control y testigo. La IV que presentó 7 colonias de alta densidad celular sobre un total de 29 evaluadas, fue más potente que el tratamiento solo con los BF: AZ, con 23 colonias de alta celularidad de 52 colonias evaluadas y RIS con 23 colonias de alta celularidad sobre 57 colonias.

IV no mostró diferencias significativas con EHDP, que, de 49 colonias observadas, 15 presentaron alta densidad celular. La combinación de IV con EHDP (3 colonias con alta celularidad sobre 28 colonias) disminuyó la celularidad en forma significativa respecto a los tratamientos no combinados. La combinación del RIS con la IV fue el tratamiento más efectivo, presentando una colonia con alta densidad celular sobre 18 colonias observadas. (Figura 11).

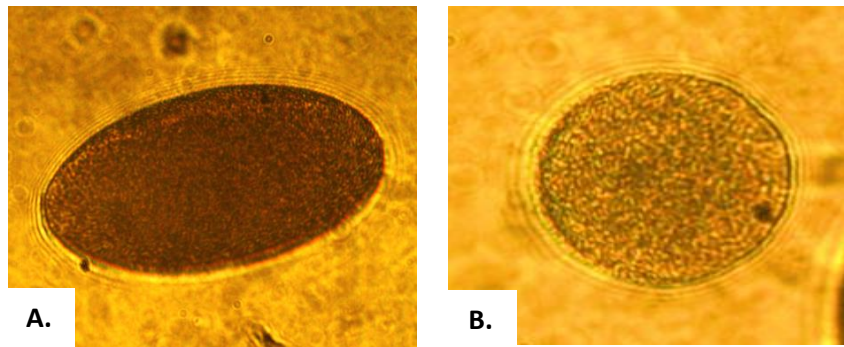


Figura 10. Colonias de células EGPE formadas en agarosa 2 %, observadas con un aumento de 400 x. A. colonias con alta densidad celular. B. Colonias con celularidad baja.

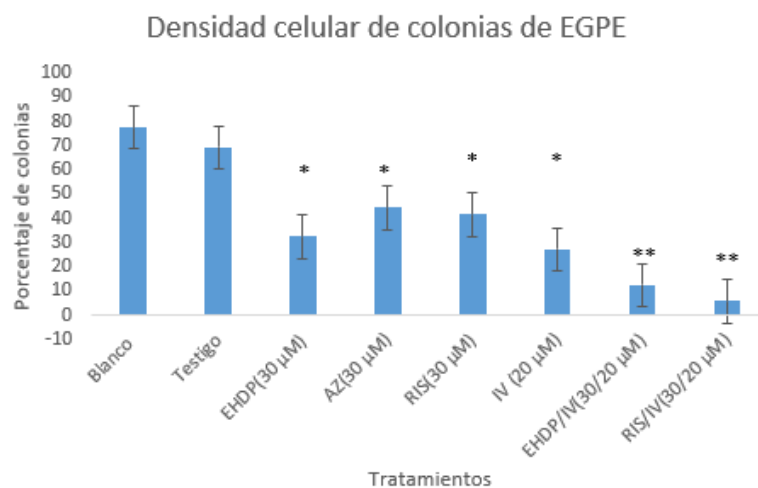


Figura 11. Porcentaje de colonias con alta celularidad después de los tratamientos con etidronato (EHDP), ácido zoledrónico (AZ), risedronato (RIS) 30 µM e ivermectina (IV) a 20 µM y la combinación de ivermectina (IV) con los tres BF. * $p < 0,05$, evaluado por χ^2 , respecto a los grupos blanco y testigo. ** La combinación de RIS + IV mostró diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto a EHDP + IV.

9.2 Estudio ex vivo

9.2.1 Viabilidad de las oncosferas contenidas en proglótides de *Taenia Hydatigena* y *Echinococcus granulosus*

La evaluación de viabilidad de las oncosferas en *T. hydatigena* mostró un aumento significativo en el porcentaje de ONV en los tratamientos con BF a comparación de los grupos control y testigo ($p < 0,05$) con medias $\pm$ SD (desviación estándar) de ONV de $2 \pm 0,24$ para el control y $3 \pm 0,15$ para el testigo.

Los valores de medias $\pm$ SD de ONV para los BF son: OPD ($39 \pm 1,2$), AZ ($27 \pm 1,3$) e IB ($23 \pm 1,4$).

La prueba post hoc, no mostró diferencias significativas entre los BF (Figura 12).

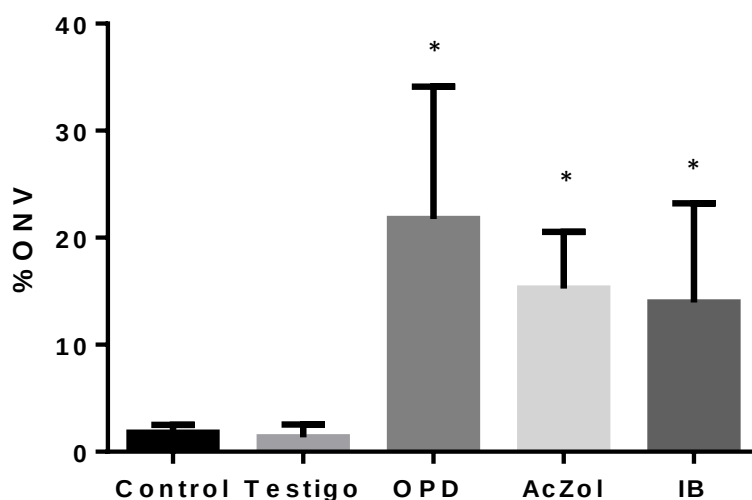


Figura 12: Porcentaje ONV después de los tratamientos con olpadronato (OPD), ácido zoledrónico (AZ) e ibandronato (IB) 1,5 %. Se muestra diferencia significativa ($p < 0,05$), respecto a los grupos control y testigo.

En *E. granulosus* no se pudo evaluar la viabilidad de las oncosferas debido al escaso material recuperado. Principalmente, por no encontrarse tenias enteras después de los tratamientos.

9.2.2 Examen histológico en *T. hydatigena*

9.2.2.1 Cantidad de oncosferas en formación en *T. hydatigena* tratada con bisfosfonatos

Los promedios de la cantidad de oncosferas inmaduras (Figura 13) fueron evaluados por ANOVA de una vía, muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) de disminución de huevos en formación, en los grupos de tratamiento con OPD, AZ e IB al 1,5 % y la con la combinación EHDP+IV (1,5; 0,45 %), en comparación a los grupos control y testigo (Figura 14). La comparación entre grupos de tratamientos, post hoc Tuckey, no mostró diferencias entre estos grupos, pero se sigue manteniendo la diferencia entre los grupos tratados y el control y el testigo.

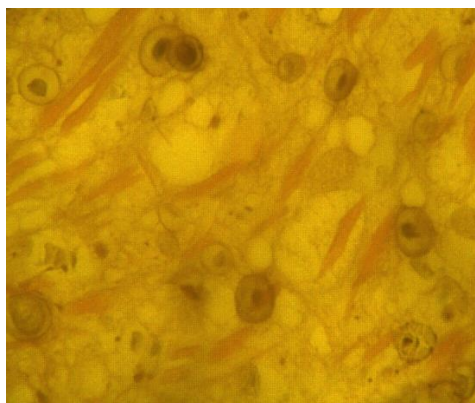


Figura 13. Oncosferas inmaduras de *Taenia hydatigena*, observadas con un aumento de 400 x con tinción hematoxilina-eosina.

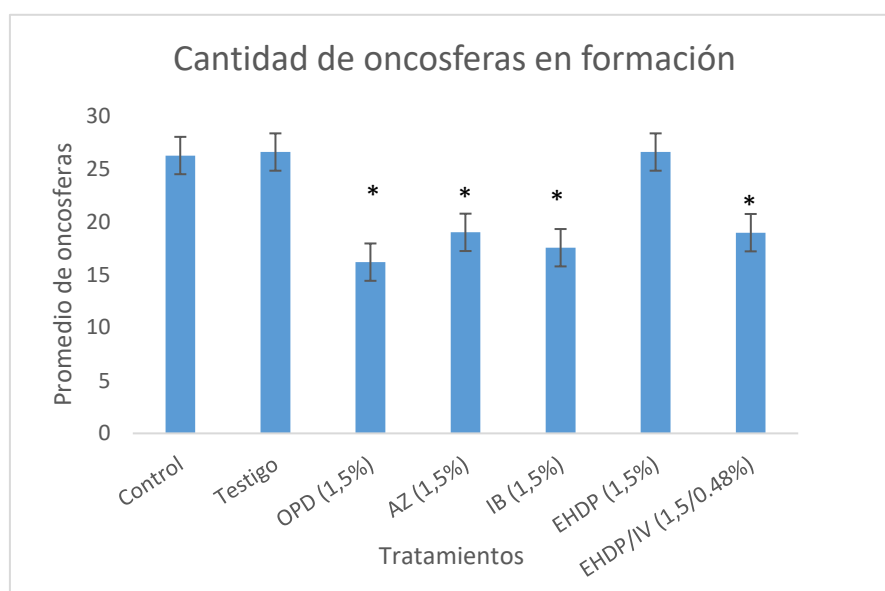


Figura 14. Proglótides de *Taenia hydatigena* tratadas con olpadronato (OPD), ácido zoledrónico (AZ), ibandronato (IB) y etidronato (EHDP) al 1,5 %. El EHDP se combinó con la ivermectina (IV) (1,5 / 0,48 %). * $p < 0,05$, evaluado por ANOVA de una vía, tratados respecto a los grupos control y testigo.

9.2.2.2 Evaluación de la cantidad de oncosferas maduras en *Taenia hydatigena* tratada con bisfosfonatos

Para este análisis sólo se tomaron en cuenta las oncosferas enteras, con bordes definidos como se observa en la figura 15.

Se observó diferencia significativa ($p < 0,05$) en la disminución de la cantidad de oncosferas maduras en los grupos tratados con OPD, EHDP, AZ y la combinación EHDP+IV, respecto a los grupos control y testigo. Los parásitos tratados con IB no tuvieron diferencias significativas con el control ni con el testigo.

La evaluación entre grupos con la prueba Tuckey mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) en la disminución de oncosferas maduras entre EHDP, OPD, AZ y EHDP+IV, observándose una mayor reducción en la cantidad de oncosferas maduras en los parásitos tratados con la combinación EHDP + IV ($p < 0,05$). (Figura 16)

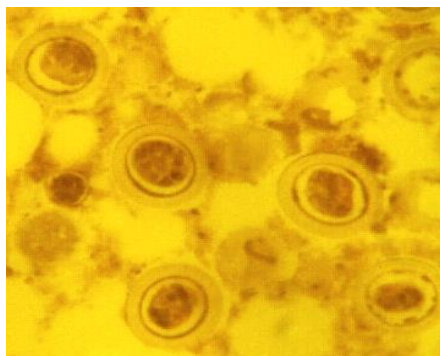


Figura 15. Oncosferas maduras de *Taenia hydatigena* observadas con 400 x de aumento. Tinción hematoxilina-eosina.

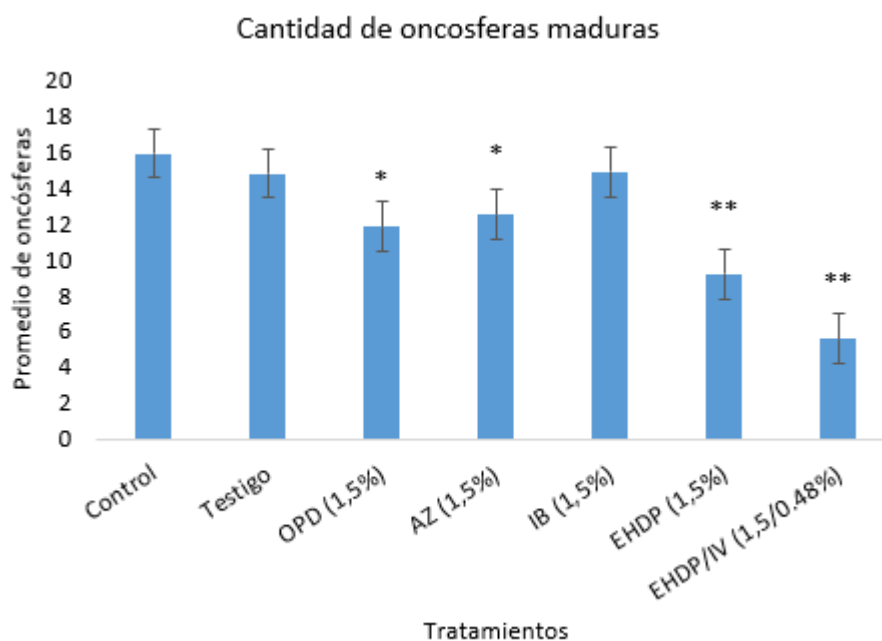


Figura 16. *Taenia hydatigena* tratadas con olpadronato (OPD), ácido zoledrónico (AZ), ibandronato (IB) y etidronato (EHDP) al 1,5 % y con la combinación de ivermectina (IV) y EHDP (0,48 /1,5 %.) * $p < 0,05$, evaluado por ANOVA de una vía, respecto a los grupos tratados con control y testigo. ** $p < 0,05$, evaluado por Tuckey: combinación EHDP+ IV tiene diferencia significativa con OPD, AZ y EHDP. OPD y AZ no son diferentes.

9.2.3 Análisis histoquímico en *Taenia hydatigena*

9.2.3.1 Depósito de calcio oncosferas maduras de *Taenia hydatigena* tratada con Bisfosfonatos

Se evaluó la proporción de las oncosferas maduras de *T. hydatigena* en las que existía presencia de calcio en la zona del embrión (Figura 17).

Después del análisis de los datos mediante Chi cuadrado, se encontró diferencia significativa ($p < 0,05$) entre la proporción de depósito de calcio en embrión en los grupos de tratamiento con OPD (media $\pm$ SD: $12,26 \pm 4,15$), AZ ($30,59 \pm 1,34$) e IB ($11,76 \pm 1,67$) al 1.5 %, a comparación a los grupos control ($2,4 \pm 1$) y testigo ($4,74 \pm 1,9$), donde se observa un aumento en el porcentaje de oncosferas maduras con calcio en embrión en los parásitos tratados con BF (Figura 18).

El AZ estimuló los depósitos de calcio en las oncosferas en forma significativa respecto al OPD e IB.

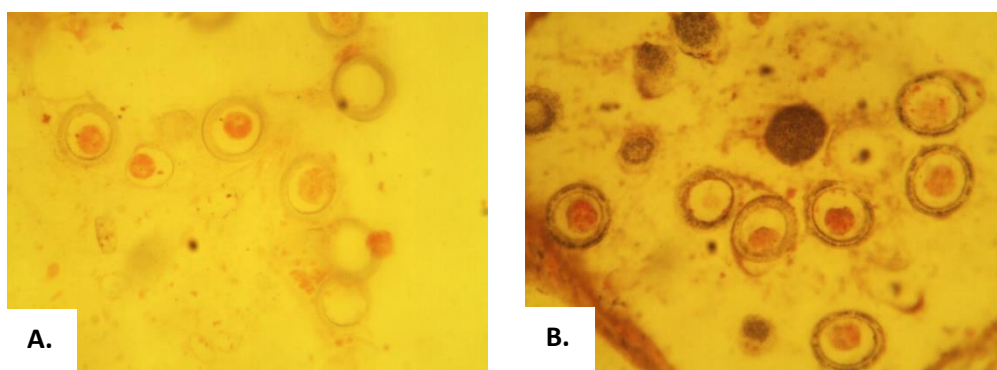


Figura 17. Comparación de muestras histológicas teñidas con Von Kossa para la identificación de depósito de calcio. A. Muestra control. B. Muestra tratada con AZ.

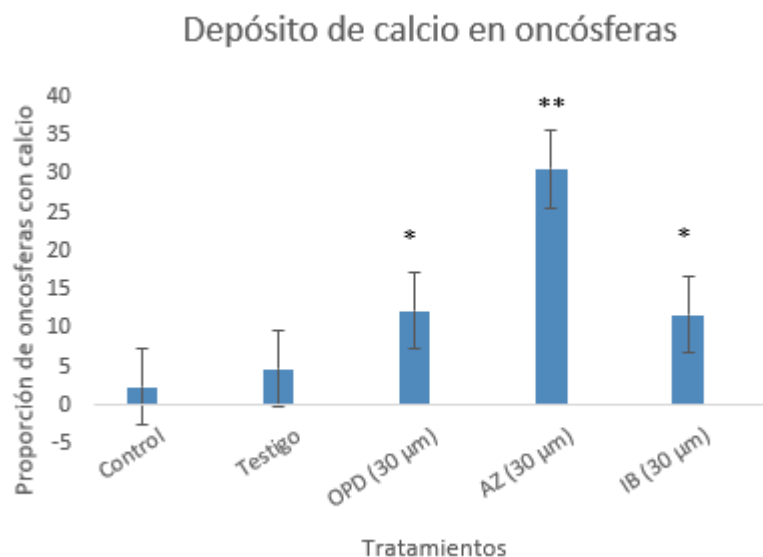


Figura 18. *Taenia hydatigena* tratadas con olpadronato (OPD), ácido zoledrónico (AZ) e ibandronato (IB) al 1,5 %. * $p < 0,05$, evaluado por χ^2 , respecto a los grupos control y testigo. ** $p < 0,05$, AZ es diferente significativamente respecto a todos los tratamientos.

El EHDP (media $\pm$ SD: $8,31 \pm 5,53$) y la combinación de EHDP / IV ($9,19 \pm 4,05$) no mostró aumento de depósito de calcio respecto al grupo testigo ($8,02 \pm 4,40$). (Figura 19)

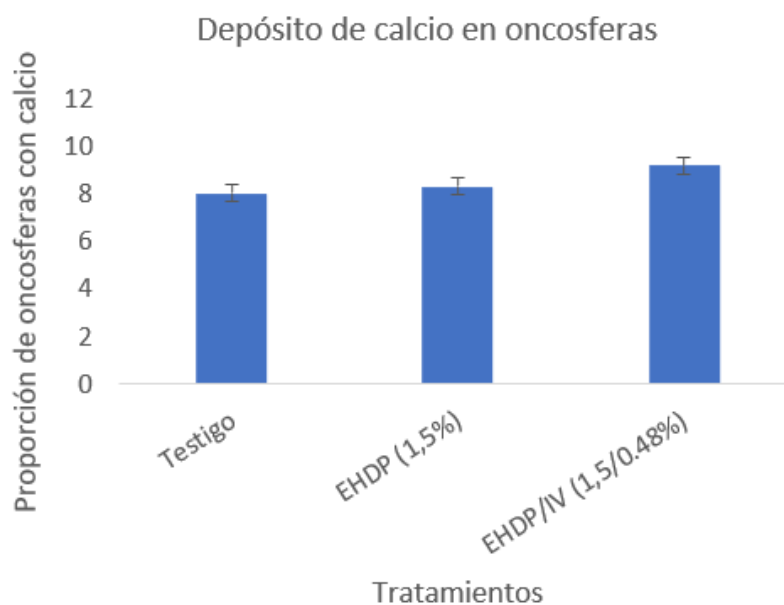


Figura 19. *Taenia hydatigena* tratadas con etidronato (EHDP) al 1,5 % o la combinación de EHDP e ivermectina (IV) (1,5 / 0,48 %). * $p < 0,05$, evaluado por χ^2 , respecto al testigo.

9.2.4 Evaluación del efecto del ácido zoledrónico y su combinación con la ivermectina en *Echinococcus granulosus* (Análisis histológico)

Debido a la gran diferencia de tamaño de *E. granulosus* (hasta 7 mm) comparado a *T. hydatigena* (hasta 500 μ m) y a que es rara vez encontrado en las desparasitaciones, los procesos de incubación de ambos parásitos fueron distintos.

Las muestras se incubaron en medio nutritivo y se trataron con AZ, IV y su combinación, además de realizar los controles y testigos correspondientes. Se investigó si su integridad se mantiene y si en condiciones de incubación ex vivo las proglótides liberaban las oncosferas al medio ambiente. En la Figura 20 se muestran las proglótides testigo y tratadas. Las proglótides de *E. granulosus* del grupo testigo, liberaron al medio nutritivo, oncosferas maduras y en los otros grupos, sobre todo en los que tenían en su tratamiento IV, se observó liberación de oncosferas hialinas (Figura 21 A, B y C, respectivamente). Por lo que se consideró que los BF (en este caso el AZ) y la IV desfavorecían la liberación de los embriones maduros infectivos al medio ambiente.

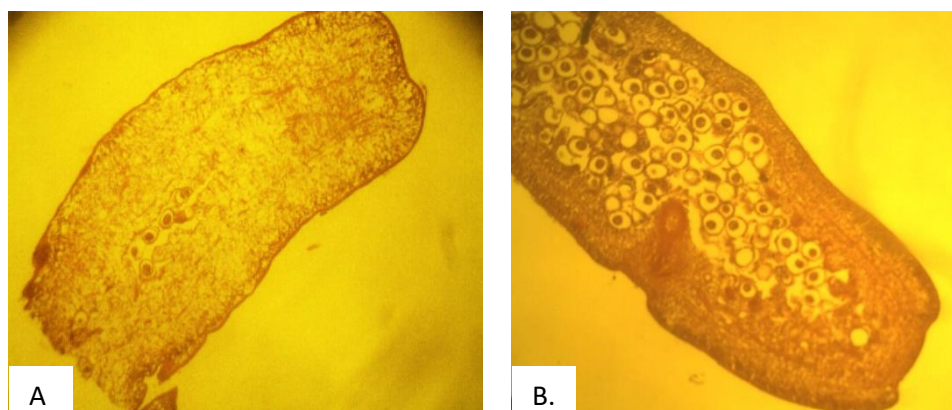


Figura 20. Proglótides de *E. granulosus* observadas con aumento 100 x donde se observa: A. Parásito del grupo testigo conteniendo una cantidad reducida de oncosferas maduras. B. Parásito tratado con ácidos zoledrónico (AZ), donde la proglótide retiene gran cantidad de oncosferas. Tinción Hematoxilina eosina.

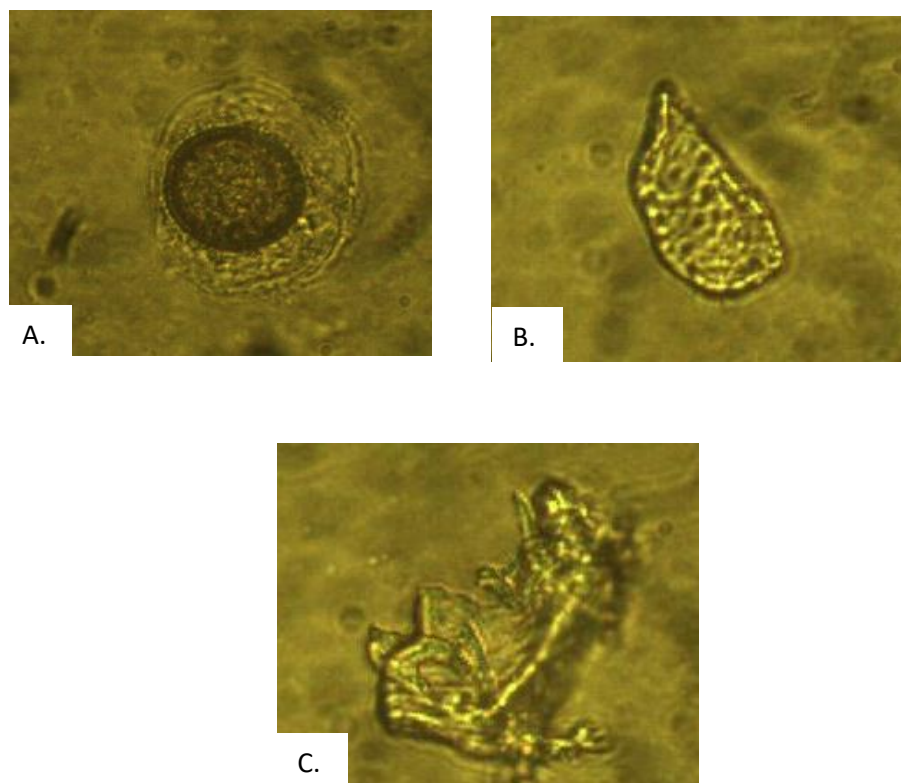


Figura 21. Estructuras observadas en el medio nutritivo de cada tratamiento con aumento 400 x. A. Oncosfera madura en el medio nutritivo del grupo testigo. B. Formación hialina en el tratamiento con (ivermectina) IV. C. Estructura hialina en el medio nutritivo con (ácido zolédronico + ivermectina (AZ + IV)).

Para este análisis sólo se evaluaron oncosferas maduras, con bordes redondeados y completas observadas a 400 x de aumento. (Figura 22). porque las inmaduras no se podían individualizar correctamente, su disposición anatómica es diferente a la encontrada en *T. hydatigena*.

Se encontró que los grupos tratados poseían en sus proglótides más oncosferas con diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto al grupo control.

Luego del análisis post hoc con la prueba Tuckey, mostró que el grupo tratado con AZ tenía mayor cantidad de oncosferas que el grupo AZ / IV ($p < 0,05$). Sin embargo, no se observaron diferencias entre los grupos IV y AZ ni entre IV y AZ + IV (Figura 23).

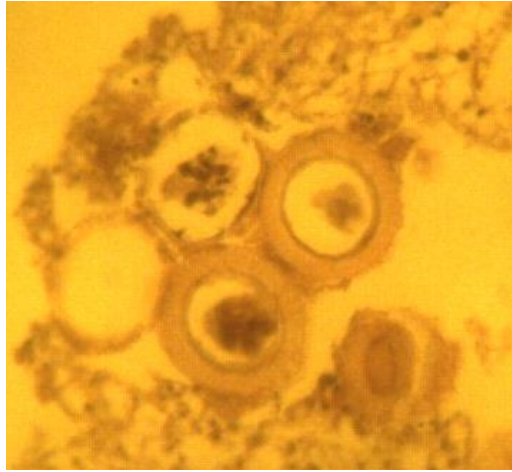


Figura 22. Oncosferas maduras de *E. granulosus* observadas con 400 x de aumento. Hematoxilina-eosina.

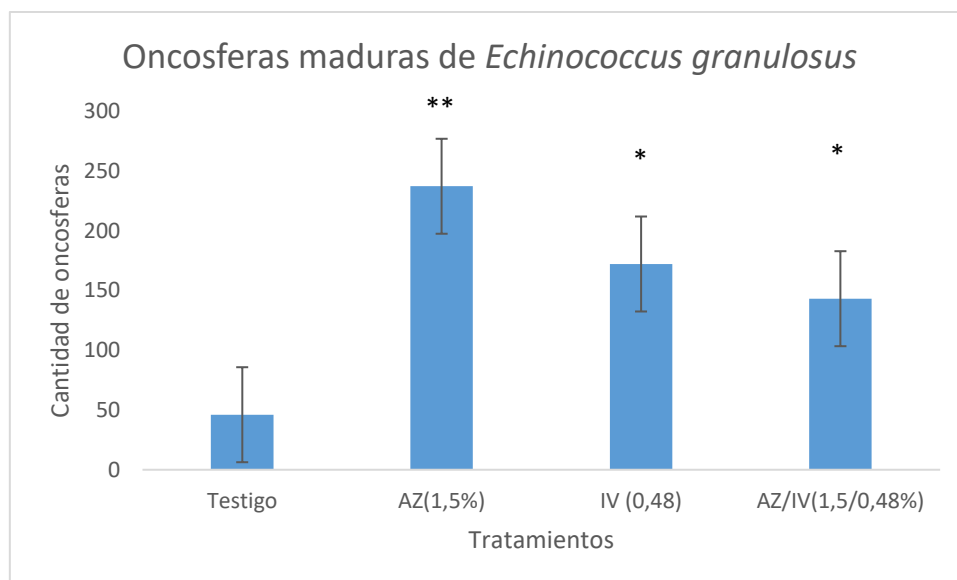


Figura 23. *E. granulosus* incubados con ácido zoledrónico (AZ), ivermectina (IV) e ivermectina/ácido zoledrónico AZ / IV; 1,5 % / 0,48 % * $p < 0,05$, evaluado por ANOVA de una vía, respecto al testigo. ** $p < 0,05$ entre el ácido zoledrónico y el resto de los tratamientos.

9.2.5 Escalamiento de los resultados a la investigación clínica farmacológica

Los resultados del estudio in vitro y ex vivo en este trabajo, muestran el efecto favorable del BF en la reducción de la supervivencia del parásito al disminuir la viabilidad de las oncosferas causantes de la propagación de la enfermedad. Entendiendo que el parásito adulto desarrolla los huevos dentro del intestino del hospedador definitivo, en este estudio, se propone al perro como objetivo final del tratamiento.

En este punto, se plantea un protocolo hipotético para estudiar la efectividad del tratamiento antiparasitario con BF.

Título del Estudio: Ensayo Clínico de Fase II para Evaluar la Eficacia y Seguridad de Ivermectina en combinación con Bisfosfonato en comparación al efecto del *gold standard*: el tratamiento con Praziquantel en Perros Infectados con *Echinococcus granulosus* y *Taenia hydatigena*.

Objetivos

Este ensayo clínico de fase II tiene como objetivo evaluar la eficacia y seguridad de un nuevo enfoque terapéutico en perros infectados con *E. granulosus* y *T. hydatigena*. Se comparará la eficacia de la combinación de ivermectina y bisfosfonato con el *gold standard*, el praziquantel.

El estudio se llevará a cabo de acuerdo con las regulaciones y pautas vigentes en Argentina para la investigación clínica en animales y las dosis que se utilizan son aquellas que han sido determinadas como efectivas en los perros.

Diseño del Estudio: Abierto Aleatorizado de Fase II

A- Protocolo Experimental

1. **Selección de Sujetos:** Se incluirán los perros de las áreas hiperendémicas a los cuáles se les realiza el catastro de infección y el control de la transmisión primaría
2. **Tamaño muestral:** Calculado con un IC:95%, error 5% y un porcentaje de infección esperado de 40 %. El tamaño muestral es de 368 perros, la mitad de la muestra al grupo del *gold standard* y la otra mitad al tratamiento experimental.
3. **Grupos de Tratamiento:** Los perros serán asignados aleatoriamente a dos grupos de tratamiento:
 - Grupo 1: ivermectina + etidronato de sodio (Tratamiento experimental)
 - Grupo 2: praziquantel (*gold standard*).
4. **Administración de Tratamientos:** Cada grupo recibirá los tratamientos correspondientes de acuerdo con el protocolo definido.

Vía de administración: Oral

Dosis: Grupo 1: ivermectina + etidronato de sodio: 6 µg / kg + 10 mg/kg (dosis elegidas por datos de efectividad y seguridad de estudios publicados **(64) (65)**)

Grupo 2: praziquantel: 5mg / kg **(3)** .

5. Seguridad del Tratamiento:

La seguridad del tratamiento se evaluará mediante la monitorización continua de los perros en busca de posibles efectos adversos como gastritis y diarrea.

Se realizarán análisis sérico de enzimas hepáticas y análisis de orina donde se buscará también la excreción del BF.

Se registrará y analizará detalladamente cualquier signo clínico anormal o reacción adversa relacionada con los tratamientos. Con mayor vigilancia en signos de efectos gastrointestinales (vómito espumoso amarillento, aumento de la ingesta de agua, falta de apetito).

A los 45 días del tratamiento se realizará la desparasitación convencional en los perros del grupo experimental, teniendo en cuenta que la fórmula administrada puede no tener ningún efecto.

6. Evaluaciones Clínicas y Parasitológicas:

Para la evaluación de la capacidad infectiva de las oncosferas, se trabajará con ovejas jóvenes de 4 a 6 meses provenientes de lugares sin infestación parasitaria, que serán separadas de la madre y alimentadas con comida procesada balanceada y agua ad libitum en corrales cerrados en locaciones no endémicas.

El modo de infección de las ovejas se realizará según el protocolo descrito en Lightowlers M, et al.(30), con el fin de evitar la contaminación del operador y procurar la misma cantidad de oncosferas para la infección de las ovejas.

Luego de 12 meses, las ovejas serán sacrificadas en un matadero controlado por SENASA y se buscarán quistes parasitarios en la necropsia.

B- Consideraciones Éticas y Legales:

1. **Consentimiento Informado:** Se obtendrá el consentimiento informado por escrito de los propietarios de los perros, donde se detallará las implicaciones del tratamiento, efectos adversos, selección del grupo de tratamiento y beneficios, garantizando que estén plenamente informados y consientan la participación de sus mascotas en el estudio. Se le comunicará al dueño del perro que posiblemente su perro será sujeto a una desparasitación complementaria en 45 días.
2. **Autorización de la municipalidad.** El municipio tendrá que estar de acuerdo que en el catastro y desparasitación estandarizado de los establecimientos rurales se realizará un tratamiento experimental a los animales de la zona, porque la equinococosis quística constituye una zoonosis endémica que afecta la salud de los humanos.
3. **Cumplimiento de Regulaciones:** El estudio cumplirá con todas las regulaciones y pautas vigentes en Argentina para la investigación clínica en animales.
4. **Infección experimental de ovinos:** Los ganaderos y el municipio, de la zona, tendrán que consentir para la realización del trabajo experimental en la zona no endémica que se realiza en forma controlada.
5. **Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE):** El estudio seguirá las normativas establecidas por el CICUAE local para garantizar el bienestar y el cuidado adecuado de los animales de experimentación, en este caso perros y ovejas.
6. **Sacrificio de los animales en un matadero controlado por SENASA**

C- Análisis Estadístico:

Se utilizarán los siguientes métodos estadísticos para analizar los datos recopilados:

1. **Pruebas de Comparación:** Se emplearán pruebas estadísticas como análisis de varianza (ANOVA), para comparar las diferencias en la eficacia entre los grupos de tratamiento.
2. **Análisis de Seguridad:** Se realizará un análisis estadístico de los datos de seguridad para detectar cualquier diferencia significativa en las reacciones adversas entre los grupos de tratamiento.

Conclusiones: Este ensayo clínico de fase II busca proporcionar información valiosa sobre la eficacia y seguridad de la combinación de IV y EHDP en comparación con praziquantel, en el tratamiento de perros infectados con *E. granulosus* y/o *T. hydatigena*. Los resultados podrían contribuir al desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos en la práctica veterinaria para interrumpir el ciclo biológico de estos parásitos. Otros protocolos alternativos con el mismo formato de investigación clínica podrán ser propuestos como el uso del praziquantel con EHDP o IV o bien la combinación de otros BF con capacidad ovicida ex vivo.

10. DISCUSIÓN

Las infecciones por *Cestodes* tienen un gran impacto global, no sólo por las pérdidas económicas en el sector ganadero, donde se decomisan órganos o incluso ejemplares enteros de ovinos, bovinos y porcinos, infectados por parásitos como *T. hydatigena*, sino también, porque amenazan la salud pública debido a que muchos de estos parásitos infectan a los humanos quienes participan activamente en algunos ciclos biológicos de *Cestodes* como *T. solium* o *T. saginata* o tienen una implicación accidental, como en el ciclo de vida del *E. granulosus* (64).

Una de las dificultades para la erradicación de estas enfermedades, es la estrecha interacción de los humanos con algunos de los hospedadores de estos parásitos. La relación que existe entre las personas por sus actividades y los perros, que es el animal doméstico por excelencia, son las causas que permiten la diseminación de la *T. hydatigena* y del *E. granulosus*, dos de los parásitos con mayor incidencia de infección en ganado (95% en zonas hiperendémicas) y, en el caso de *E. granulosus*, de relevancia en la salud humana (4).

La prevención primaria de la infección por *T. hydatigena* y *E. granulosus*, es la desparasitación de los perros con praziquantel a una dosis de 5 mg / kg. Esta droga tiene un 100% de efectividad tenicida sobre los *Cestodes* adultos, debido a que actúa sobre el tegumento del parásito causando parálisis del sistema neuromuscular y muerte, sin embargo, no tiene efecto sobre los huevos, los cuales pueden mantenerse viables hasta por 4 meses, infectar y desarrollar quistes; como se ha observado en estudios realizados en ovejas y ratones (65) (66).

Debido a la nula capacidad ovicida del praziquantel, se recomienda eliminar las heces de los perros después de la desparasitación, ya sea, quemando o enterrándolas, sin embargo, estas recomendaciones no siempre se siguen, sobre todo, cuando la desparasitación no es realizada por la municipalidad o el centro de zoonosis local. En las campañas de desparasitación canina se entrega en forma gratuita a los dueños de los perros el antiparasitario y queda a criterio del propietario si desparasita su perro y el tratamiento de las heces.

Debido al fracaso del praziquantel como ovicida, la búsqueda de un compuesto farmacológico aprobado para su uso en humanos y animales es ventajoso si se puede comprobar su capacidad ovicida. Los fármacos que se proponen en este trabajo son de la familia de los BF. Los BF han sido ampliamente estudiados y se conoce su seguridad en los tratamientos en humanos y animales y su efecto sobre el ambiente.

En estudios realizados en aguas residuales y sedimentos se encontraron trazas de fosfonatos asociados a calcio o magnesio que no representan un peligro de toxicidad. (67). En plantas y suelos agrícolas se registraron concentraciones de fosfonatos de 0,01 mg / kg, que son mínimas en comparación a la concentración de metales pesados como cadmio, plomo, cobre o zinc encontrados en un rango de 0,1 a 50 mg / kg (68) (69). Este efecto en el medio ambiente sería importante porque los BF se liberan sin degradación con la materia fecal de los perros, o bien podrían ser utilizados para eliminar las oncósferas depositadas con la materia fecal de los perros en el peridomicilio. Se ha probado, en este trabajo, el efecto ovicida de los BF e IV sobre *T. hydatigena*, incubados con materia fecal, comprobándose la persistencia de la acción de estos fármacos en presencia de bacterias y residuos fecales.

En esta investigación se probaron NBF y nMBF, estos compuestos difieren en su mecanismo de acción. El EHDP es un nNBF que produce su acción sobre los osteoclastos al formar análogos no hidrolizables de ATP que se acumulan y causan la muerte celular. Además, debido a su homología con el PPI pueden actuar sobre enzimas como las tirosina-fosfatasa que tienen importancia en la traducción de señales, control

de crecimiento y diferenciación celular. El clordronato, otro nNBF, tiene un efecto citoprotector y de diferenciación en osteoblastos **(70) (71)**.

Los NBF, como el AZ, OPD e IB, utilizados en este trabajo, tienen como principal mecanismo de acción, la inhibición de metabolitos en la vía del mevalonato como el farnesil pirofosfato o geranilgeranil fosfato, enzimas que intervienen en la prenilación de pequeñas proteínas GTPasas, involucradas en las funciones de supervivencia celular. Se ha observado en estudios sobre fibroblastos y osteoblastos que NBF, como AZ y pamidronato, tienen efectos antiproliferativos, además AZ, es capaz de causar la apoptosis inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF) en células endoteliales **(72)**. El efecto antiproliferativo de los BF utilizados en este estudio, se evidencia, in vitro, al disminuir la cantidad de colonias de EGPE formadas en agarosa y su densidad celular. Se observó en este modelo celular que el EHDP muestra mayor efectividad frente a AZ y RIS, confirmándose la eficacia mostrada, en estudios anteriores, comparando su efecto antiproliferativo con el ejercido por el OPD, IB y pamidronato, en donde la cantidad de colonias quísticas de EGPE era reducida por todos los BF, pero sólo EHDP presentaba un aumento en el depósito de calcio **(49)**. En células de cáncer de mama se observó que el AZ y clordronato inducen la apoptosis activando la cascada de caspasas **(73) (74)**. Este mecanismo de apoptosis se ha comprobado en protoescolices de *E. granulosus* irradiados con rayos-X, donde se determinó la activación de las caspasas 3 y 12, principalmente **(75) (76)**.

La reducción del número de colonias quísticas de EGPE en el tratamiento con IV es incluso mayor al que se observó con BF, lo que refuerza la idea de su efecto protoescolicida sobre *E. granulosus*. La IV ha sido estudiada en quistes hidatídicos resultando en un 50% de reducción en la viabilidad de los protoescolices, demostrándose el efecto en el tegumento de los protoescolices, órgano que tiene la función de interactuar con el medio ambiente. La IV impediría la secreción de factores inmunomoduladores inhibitorios de la respuesta del hospedador. Su mecanismo de acción se debe a la unión a los canales de cloro mediados por glutamato que despolarizan el tegumento del parásito e impiden la función de los poros secretores **(77)**. El efecto de la IV, los BF y su combinación fueron estudiadas in vitro sobre la capacidad de las células EGPE de formar colonias en agarosa **(62)**.

El sistema de cultivo en colonias celulares es un sistema de estudio de farmacología experimental, utilizado también en fármacos anticancerosos, porque las células adquieren, en su conjunto, una conformación tridimensional. Las combinaciones de AZ+IV y RIS+IV disminuyeron significativamente la formación de colonias respecto a todos los tratamientos, lo que puede deberse a que RIS y AZ presentan mecanismo de acción y efecto antirresortivo equivalentes siendo el AZ una alternativa de administración endovenosa del RIS.

El estudio ex vivo, en este trabajo, se realizó con parásitos obtenidos de perros naturalmente infectados, debido a esto, fue muy poco frecuente encontrar tenias de *E. granulosus*, por lo que se decidió utilizar los ejemplares de *T. hydatigena* que se recuperaban de las heces de los perros desparasitados con arecolina.

Ambos parásitos son *Cestodes*, por lo que sus estructuras fisiológicas son comparables, tienen ciclos de vida análogos, comparten los mismos hospedadores intermediarios (excepto el hombre) y definitivos. Además, las conformaciones estructurales de los huevos de ambos parásitos son similares. **(7)**

La proglótide de *T. hydatigena* presenta dos secciones bien definidas, una región en contacto con la capa muscular de oncosferas inmaduras y una región central con oncosferas maduras. En *T. hydatigena* se observó que la cantidad de oncosferas inmaduras presentes en las proglótides disminuyeron con los tratamientos de OPD, IB, AZ y la combinación de EHDP + IV, que fue significativamente menor, que la utilización

de los otros BF como monodroga. El EHDP, como monodroga, disminuyó significativamente las oncosferas maduras, tal vez porque forma ATP no utilizable impidiendo, de esa forma, la maduración de las oncosferas. En cambio, AZ, OPD e IB que son NBF, afectan directamente la viabilidad de todas las oncosferas sin importar su estado de maduración. Esta diferencia podría deberse a los distintos mecanismos de acción de los BF debido a la presencia de nitrógeno en sus estructuras químicas **(32) (39)**.

Respecto a la reducción de oncosferas en formación con el tratamiento de EHDP + IV, se observó, el efecto de IV, sobre las oncosferas maduras, adicionado al efecto inhibitorio de la maduración de oncosferas por parte del EHDP, la sinergia o potenciación de estos efectos, dan como resultado, que la combinación de ambos es más efectiva que la utilización de los BF como monodroga. Ni el EHDP, ni la combinación de EHDP+IV mostraron depósito de calcio en el embrión, sin embargo, el tratamiento de las proglótides con AZ presentan un 30% de oncosferas positivas para el depósito de calcio, los tratamientos con OPD e IB que no presentan más del 15 % de oncosferas positivas. El AZ es el BF con la mayor capacidad de unirse al calcio y formar complejos y 1000 veces más potente que el EHDP, lo que explicaría la diferencia del efecto en la acumulación de calcio en el interior de la oncosfera **(34)**. Los resultados de esta tesis muestran, sin embargo, que el EHDP sería el BF de mayor efecto sobre las colonias en agarosa, por lo que se puede inducir que la acumulación de calcio no es un factor determinante para la muerte celular, sino que se trataría de una acumulación distrófica producida por la suma de la muerte celular más la acumulación de AZ o IB.

En *E. granulosus*, solo se logró evaluar la cantidad de oncosferas maduras encontradas en proglótides, porque las estructuras como las oncosferas inmaduras no pudieron ser diferenciadas ni evaluadas.

En un primer estudio, se trató la tenia de *E. granulosus* con BF incubándose en materia fecal / PBS al 50 %, en este caso y a diferencia de la *T. hydatigena* se encontraron las proglótides rotas con muy pocas oncosferas en su interior. Por el motivo expuesto, se decidió incubar las tenias de *E. granulosus* en medio nutritivo con BF para entender la razón de la ausencia de oncosferas. En el experimento se observó que el *E. granulosus* control liberaba gran cantidad de oncosferas en el medio nutritivo, lo que no sucedía en el tratamiento con AZ, IV o la combinación de ambos. En el estudio histológico, se confirmó que las proglótides de los *E. granulosus* tratados con AZ contenían gran cantidad de oncosferas maduras, en menor medida los tratados con IV o la combinación AZ + IV y finalmente los controles presentaban escasas oncosferas. Por esto, se concluyó que los BF actúan, en el *E. granulosus*, impidiendo la liberación de oncosferas. La observación del medio nutritivo por microscopía, luego de la incubación, reveló la presencia de estructuras hialinas en los tratamientos con IV y AZ + IV, mientras que en el control se pudieron identificar oncosferas maduras enteras.

Se asume que todos los *Cestodes*, una vez que alcanzan la madurez sexual, se reproducen y sus huevos maduros son almacenados en las proglótides grávidas **(7) (17)**. En esta experiencia se observó que *E. granulosus* expulsa la mayor parte de los huevos en forma libre en las heces del perro, o bien las proglótides son desintegradas por las bacterias que están en la materia fecal colaborando en la liberación de los huevos embrionados. Otra diferencia es que se ha descrito que las oncosferas del *E. granulosus* cuentan con un embrióforo grueso formado por bloques de queratina y una sustancia cementante, que hacen a las oncosferas más resistentes a las condiciones ambientales. En cambio, la oncosfera de la *T. hydatigena* no cuenta con una capa protectora resistente, pero sí con una proglótide más resistente que no sería dañada por la materia fecal, motivo por el cual, la mayoría de los huevos permanecerían en la proglótide hasta activarse en el aparato digestivo del hospedador intermediario **(7) (20)**.

En sus estados larvarios, se desarrollan en ambos *Cestodes*, vesículas de almacenamiento de sales y minerales llamados corpúsculos calcáreos. Algunas de las funciones de estas estructuras son la captación de sales de fosfato y su posterior almacenamiento como fosfonatos, para mantener la producción de ATP y la regulación y depósito de calcio, para evitar la calcificación del parásito, durante su etapa de adaptación y maduración dentro del intestino del perro. No obstante, los corpúsculos calcáreos desaparecen en la etapa de segmentación, una fase temprana del desarrollo del parásito, por lo que se especula que, debido a que los *Cetodes* adultos viven en un ambiente protegido y poseen un metabolismo lento, pueden prescindir de depósitos de fosfonatos y alterar su metabolismo para conseguir estas sales, del hospedador, cuando hay un requerimiento repentino de energía (7) (78) (79). Sin embargo, como en este estudio se recolectaron parásitos que fueron expulsados del hospedador de forma artificial y posteriormente tratados, se puede inferir que existió una situación de estrés en la que el parásito tuvo necesidad de generar energía, por lo que captó los fosfatos necesarios del medio de incubación, lo que favoreció la entrada del AZ a su organismo y, por lo tanto, se produjo la alteración en la regulación de calcio. La diferencia de tamaño entre los dos parásitos estudiados hace una diferencia en el efecto de la incubación. En el caso del *E. granulosus*, los ejemplares estaban completos, y en *T. hydatigena*, sólo se incubaron las tres proglótides terminales de la misma. Estudios realizados sobre *Cestodes* de hasta 1 cm de longitud, incubados íntegros, en medio que contenía cloruro de calcio, revelaron que la acumulación de calcio ejerce una alteración neuromuscular lo que produce una contracción que puede causar la reducción evidente del tamaño del estróbilo, esto dependería del mantenimiento de la estructura completa del sistema nervioso del parásito porque, en los segmentos aislados no se produjo la contracción muscular (7). En el *E. granulosus* la falta de liberación de oncosferas en los tratados con AZ, en medio nutritivo, podría deberse a la contracción muscular sostenida, que se puede observar en la microscopia. Esto no se observa en los ejemplares de *E. granulosus* tratados con IV o en segmentos de *T. hydatigena* tratadas con AZ. (Figura 24).

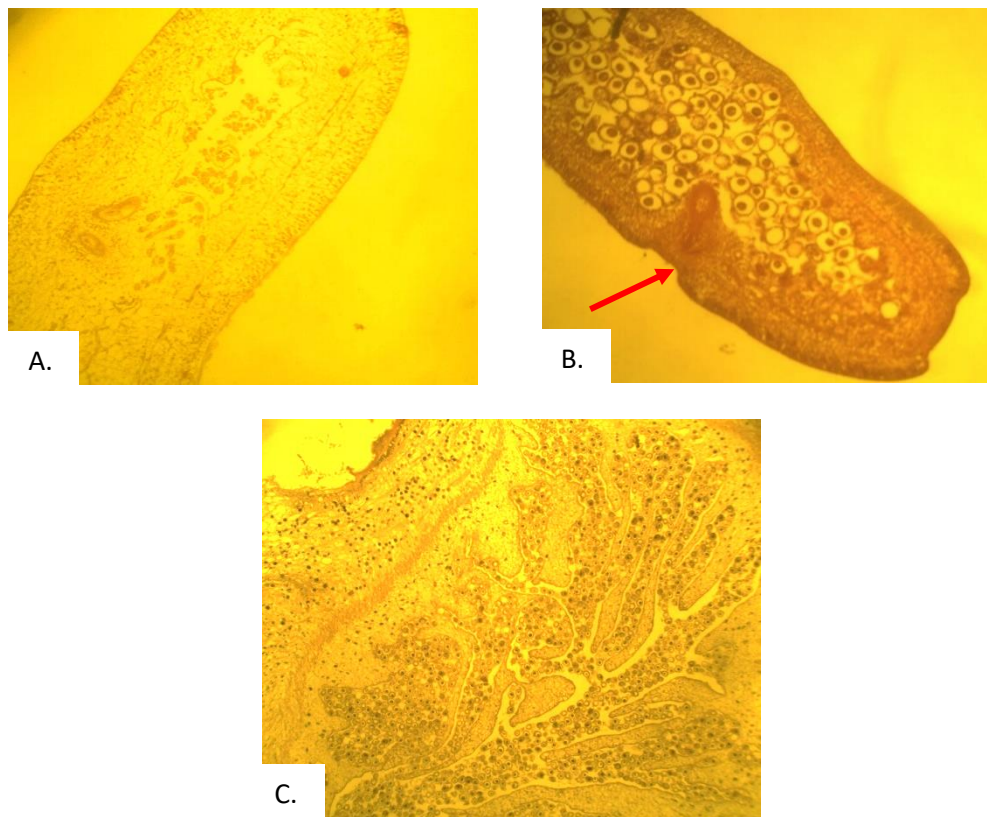


Figura 24: A. *E. granulosus* tratado con ivermectina (IV) (aumento 100 x). B. *E. granulosus* tratado con ácido zoledrónico (AZ) C. Proglótide de *T. hydatigena* tratada con AZ (aumento 50 x).

De este estudio se puede concluir que el EHDP y AZ constituyen alternativas que pueden ayudar a evitar la perpetuación del ciclo parasitario. Estos BF pueden ser evaluados en un ensayo clínico para determinar su eficacia como tratamientos en perros que son los hospedadores definitivos y que están en contacto directo con los animales y el humano (hospedadores intermediarios) que desarrollan la equinocosis quística. Debido a que la combinación de EHDP + IV fue uno de los tratamientos más efectivos en este trabajo, y que el EHDP y la IV son fármacos que se han estudiado en animales, para administración por VO, con seguridad y farmacocinética conocidas, se propuso el escalamiento de los resultados a un estudio clínico farmacológico de fase II en perros. El AZ también constituye una buena alternativa de tratamiento para reducir la infectividad de las oncosferas, sin embargo, debido a que está diseñado para su administración por VE, son necesarios más estudios para la elaboración de una forma farmacéutica (FF) segura y estable para la administración oral del fármaco y su posterior estudio clínico fase I.

Los BF son poco contaminantes en el medio ambiente por lo que pueden ser utilizados como agentes ovicidas, aplicándose directamente sobre la materia fecal del perro, en el peridomicilio y los corrales donde está facilitada la interacción entre el hospedador intermediario y el definitivo.

11. CONCLUSIONES

- Los tratamientos con BF más efectivos in vitro y ex vivo son EHDP, más efectivo en la reducción de oncosferas maduras (infectantes) y el AZ en oncosferas totales, pero menos efectivo que el EHDP en oncosferas maduras.
- La IV potencia el efecto antiproliferativo del EHDP, tanto en la formación de colonias, como en la disminución de la cantidad de oncosferas maduras en *T. hydatigena*.
- Los BF probados en este ensayo actuarían inhibiendo la maduración de las oncosferas en las proglótides de *T. hydatigena*. El BF con menor efecto fue el IB.
- En *E. granulosus*, el AZ impide la expulsión de las oncosferas a causa de la contracción muscular sostenida, después de la incubación del parásito entero manteniendo la presencia de su sistema neuromuscular.
- Por lo expuesto, la combinación EHDP+IV es el tratamiento más factible para ser estudiado clínicamente, debido a que se conoce la seguridad de ambos fármacos en medicina veterinaria.
- Son necesarios más estudios para determinar una FF estable y segura del AZ para administración oral y su posterior escalamiento a un estudio de Fase I para evaluar su seguridad y farmacocinética.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Denegri G EMDMea. La Hidatidosis en la Argentina Mar del Plata: EUDEM; 2019.
2. Guerra Montero G RBM. Hidatidosis humana en el Perú. Apunt. cienc. soc. 2015; 05(01)(94-101).
3. Ministerio de Salud de la Nación. Enfermedades infecciosas. 11th ed. M M, editor. Buenos Aires; 2012.
4. Centers for Disease Control and Prevention. CDC. [Online].; 2019 [cited 2022 octubre 10. Available from: <https://www.cdc.gov/dpdx/echinococcosis/index.html>.
5. Avila HG MAGMea. First report of cystic echinococcosis caused by *Echinococcus granulosus sensu stricto* / G1 in *Felis catus* from the Patagonian region of Argentina. Parasitol. Res. 2021; 120, 747–750.
6. CN M. An active intermediate host role for man in the life cycle of *Echinococcus granulosus* in Turkana, Kenya. Am J Trop Med Hyg. 1983; 32(2):397-404.
7. Smyth JD MD. The physiology and biochemistry of *Cestodes* New York: Cambridge University Press; 2007.
8. M. GA. Estudio seroepidemiológico de cisticercosis (*Taenia solium*, *Taenia hydatigena*) porcina y cuestionario epidemiológico de cisticercosis humana, en los productores porcinos de la Parroquia Tandapi, Cantón Mejía. Disertación. Quito: Universidad de las Américas; 2017.
9. M A. Estudio Morfológico del *Cysticercus tenuicollis* en Ovinos Faenados en Mataderos. Tesis de maestría. Latacunga: UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI; 2021.
10. Cucher MA MNBGea. Cystic echinococcosis in South America: systematic review of species and genotypes of *Echinococcus granulosus sensu lato* in humans and natural domestic hosts. Trop Med Int Health. 2016; 21(2):166-75.
11. Kinkar L. New mitogenome and nuclear evidence on the phylogeny and taxonomy of the highly zoonotic tapeworm *Echinococcus granulosus sensu stricto*. Infect. Genet. Evol. 2017; 52,52-58.
12. Santana J. Cisticercosis visceral por *Cysticercus tenuicollis* en ovinos de faena en la Provincia de Santa Cruz, Argentina. Vet. Arg. 2018; 15 (357).
13. Almeida-Secaira. Índices de *Cysticercus tenuicollis* (*Taenia hydatigena* cysts) en cavidad abdominal de ovinos faenados en el camales frigoríficos municipales. J.Selva Andina Anim. Sci. 2017; 4(2):104-115.
14. MC. R. Secuencias repetidas en el genoma de *Echinococcus granulosus*: Su utilización para la detección del parásito y estudios de variabilidad genética. Tesis doctoral. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires; 2000.

15. MV. SÁ. Caracterización estructural y funcional del Antígeno B de *Echinococcus granulosus*. Tesis doctoral. La Plata: Universidad Nacional de La Plata; 2014.
16. FA. TA. Identificación de la presencia de Hidatidosis en el Camal Municipal de la ciudad de Puyo, Provincia de Pastaza. Disertación. Quito: Universidad Central del Ecuador; 2012.
17. Galindo F SA. Hidatidosis Hepática. SCD. 2009; 4(422), 1-16.
18. González D OE. Hidatidosis hepática. In 62° Congreso Uruguayo de Cirugía; 2011; Montevideo. p. 35.
19. Vera G VFRJea. Hidatidosis Humana. Cuad.Cir. 2003; 17:88-94.
20. Galindo M GMGN. *Echinococcus granulosus* protoscolex formation in natural infections. Biol. Res. 2002; 35: 365-371.
21. The Center for Food Security & Public Health, Institute for International Cooperation in Animal Biologics. Infecciones por *Taenia*. Informe. Iowa: Iowa State University; 2005.
22. C. SA. Hidatidosis. Pequeños rumiantes. 2002; 3(2):9-15.
23. Holcman B HDSR. Ultrastructure of oncosphere and early stages of metacestode development of *Echinococcus granulosus*. Int J Parasitol. 1994; 24(5):623-35.
24. Tielens A VHJ. Unusual aspects of metabolism in flatworm parasites. In Maule A MN, editor. Parasitic flatworms: molecular biology, biochemistry, immunology and physiology.: CABI; 2006. p. 387-407.
25. Zheng Y BDBJ. Phyletic distribution of fatty acid-binding protein genes. PLoS One. 2013; 8(10).
26. MC. F. Hidatidosis: aspectos epidemiológicos, clínicos, diagnósticos y terapéuticos. Rev. Esp. Quimioter. 2015; 28(3):116-124.
27. Ministerio de Salud. MANUAL PARA EL DIAGNOSTICO, TRATAMIENTO, PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA HIDATIDOSIS EN CHILE Santiago de Chile; 2015.
28. P. P. Diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la hidatidosis. Rev Chil Cir. 2017; 69(1):94-98.
29. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Prevención y Control de la Hidatidosis en el Nivel Local: iniciativa sudamericana para el control y vigilancia de la equinocosis quística. Reporte técnico. Río de Janeiro: Organización Panamericana de la Salud; 2017.
30. Lightowlers M JOFE. Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep. Int. J. Parasitol. 1999; 29:531-534.
31. Iriarte J FEMMea. Hidatidosis: La vacuna recombinante Eg95 en hospederos intermediarios O. J, editor.: Editorial Académica Española; 2021.

32. Ibieta-Zarco B MBALMFea. Los bisfosfonatos a través de la historia. J Cancerol. 2018; 5:48-57.
33. M. FC. Diseño, síntesis y evaluación biológica de 1,1-bisfosfonatos como biológica de 1,1-bisfosfonatos como agentes antiparasitarios agentes antiparasitarios. Tesis doctoral. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires; 2017.
34. E. KB. Bisfosfonatos. Rev Esp Reumatol. 2004; 31(1):9-12.
35. Ponte Fernandez N EFRAUJ. Bisphosphonates and oral pathology I. General and preventive aspects. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2006; 11(5):396-400.
36. Vidal M MCTL. Safety of bisphosphonates. Rev. Soc. Esp. Dolor. 2011; 18(1):43-55.
37. Hawkins Carranza F JGEMDGG. MOLECULAR BASIS FOR THE MECHANISM OF ACTION OF BIPHOSPHONATES. REEMO. 2000; 9(5):169-171.
38. Cortés-Motta M FGR. Osteonecrosis de los maxilares: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. CES Odont. 2016; 29(2):65-77.
39. Hawkins Carranza F JGEMDGG. BASES MOLECULARES DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS BIFOSFONATOS. ELSEVIER. 2000; 9(5: 169-171).
40. Prates Soares A FdESRPLSea. Bisphosphonates: Pharmacokinetics, bioavailability, mechanisms of action, clinical applications in children, and effects on tooth development. Environ Toxicol Pharmacol. 2016; 42:212-217.
41. Cremers S DMTEFea. Pharmacology of bisphosphonates. Br J Clin Pharmacol. 2019; 85(6):1052-1062.
42. Suva L CAWAea. Bisphosphonates in Veterinary Medicine: The new horizon for use. BONE. 2021; 142.
43. Khan SA KJVSea. Elimination and biochemical responses to intravenous alendronate in postmenopausal osteoporosis. J Bone Miner Res. ; 12(10):1700-1707.
44. Arboleya L AMAS. Efectos adversos de los bisfosfonatos. Reumatol.Clin. 2011; 7(3):189-197.
45. P. P. Bisphosphonate-associated adverse events. Hormones. 2009; 8(2):96-110.
46. American College of Rheumatology. Bisphosphonate Therapy. [Online].; 2022 [cited 2023 enero 23. Available from: <https://rheumatology.org/patients/bisphosphonate-therapy>.
47. Docampo R SDVAea. Intracellular Ca²⁺ storage in acidocalcisomes of Trypanosoma cruzi. Biochem. J.. 1995; 310: 1005-1012.
48. Urbina J MBVSea. Trypanosoma cruzi contains major pyrophosphate stores, and its growth in vitro and in vivo is blocked by pyrophosphate analogs. J Biol Chem. 1999; 274(47):33609-15.

49. Fuchs AG ECPRFea. Proline modulates the effect of bisphosphonate on calcium levels and adenosine triphosphate production in cell lines derived from bovine *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *J Helminthol*. 2013; 88(4):459-67.
50. Ferrulli M PRFGHLea. Effect of Etidronate and Ibandronate on Cytosolic Ca²⁺ in HT29 and Parasite Cell Line from *Echinococcus Granulosus sensu lato*. *Open Parasitol. J*. 2019; 7:19-25.
51. Belda B LALP. Osteosarcoma apendicular canino: ¿qué opciones tenemos? *Clin. Vet. Peq. Anim*. 2016; 36 (4): 241 - 255.
52. Maggini A NP. Manejo del Dolor Crónico en Canino con Lesión compatible con Osteosarcoma Apendicular. Disertación. Tandil: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires; 2017.
53. W. HB. OSTEOSARCOMA CANINO; PRESENTACIÓN DE UN CASO CLÍNICO. Tesis doctoral. Montevideo: UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA ; 2015.
54. K. JA. Ivermectin: a mini-review. *Clin Toxicol (Phila)*. 2022; 60(5):571-575.
55. Laing R GVDE. Ivermectin – Old Drug, New Tricks? *Trends Parasitol.*. 2017; 33(6): 463–472.
56. El-Saber Batiha G AAIOfa. Avermectin Derivatives, Pharmacokinetics, Therapeutic and Toxic Dosages, Mechanism of Action, and Their Biological Effects. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020; 13(8):196-233.
57. Ahmadpour E GAZSAfa. Nanostructured lipid carriers of ivermectin as a novel drug delivery system in hydatidosis. *Parasit Vectors.*. 2019; 12: 469.
58. R. RC. Vademécum Académico de Medicamentos. 6th ed. México D.F.: UNAM; 2013.
59. Martin R RACS. Ivermectin: An Anthelmintic, an Insecticide, and Much More. *Trends Parasitol*. 2021; 37(1): 48–64.
60. J. V. Ivermectina: Sus Múltiples Usos, Seguridad y Toxicidad. *Rev. Chilena Dermatol*. 2010; 26(4):358-368.
61. Red Argentina de Centros de Información de Medicamentos. Ivermectina. Ficha técnica. Córdoba: Red Argentina de Centros de Información de Medicamentos; 2020.
62. Echeverría C IDPGEfa. Morphological and biological characterization of cell line developed from bovine *Echinococcus granulosus*. *In Vitro Cell.Dev.Biol*. 2010; 46:781–792.
63. Maglioco A GJBVMfa. Detection of *Echinococcus granulosus sensu lato* infection by using extracts derived from a protoscoleces G1 cell line. *Parasite Immunol*. 2019; 41(12):e12674.
64. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. Parásitos-Taeniasis. [Online].; 2013 [cited 2023 septiembre 20. Available from: <https://www.cdc.gov/parasites/taeniasis/es/epidemiologia.html>.

65. Aparicio P REGTea. Terapia antiparasitaria. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003; 21(10):579-94.
66. Thakur A PUMN. *Echinococcus granulosus*: Ovicidal Activity of Praziquantel and Bunamidine Hydrochloride. *Exp. Parasitol*. 1979; 47:131-133.
67. B N. Environmental chemistry of phosphonates. *Water Research*. 2003; 37:2533-2546.
68. JM TN. El fosfonato en el sistema agroalimentario. In XI Congreso de SEAE: «Agricultura ecológica familiar»; 2014; Almería. p. 11.
69. Alengebawy A ASQSea. Heavy Metals and Pesticides Toxicity in Agricultural Soil and Plants: Ecological Risks and Human Health Implications. *Toxics*. 2021; 9(3): 42.
70. H F. Bisphosphonates: Mechanisms of Action. *Endocr. Rev*. 1998; 19: 80-100.
71. Fromigué O BJ. Bisphosphonates influence the proliferation and the maturation of normal human osteoblasts. *J Endocrinol Invest*. 2002; 25(6):539-46.
72. Bezzi M HMBGea. Zoledronate sensitizes endothelial cells to tumor necrosis factor-induced programmed cell death:evidence for the suppression of sustained activation of focal adhesion kinase and protein kinase B/Akt. *J Biol Chem*. 2003; 278(44):43603-14.
73. Fromigue O LBJ. Bisphosphonates induce breast cancer cell death in vitro. *J Bone Miner Res*. 2000; 15(11):2211-21.
74. Walter C PAZTea. Bisphosphonates affect migration ability and cell viability of HUVEC, fibroblasts and osteoblasts in vitro. *Oral Diseases*. 2011; 17, 194–199.
75. Hanhua Hu KJCRea. Drug-induced apoptosis of *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Parasitol Res*. 2011; 109(2):453-9.
76. Mao R WGWHea. Effects of X-ray on the metaCestodes of *Echinococcus granulosus* in vitro. *BMC Infect Dis*. 2017; 21;17(1):636.
77. Casado N MNUPMea. Could ivermectin have a synergic effect with albendazole in hydatidosis therapy? *Parasitol Res*. 2002; 88(2):153-9.
78. Pawlowski L YK,TR. Observations on the possible origin, formation and structure of calcareous corpuscles in taeniid *Cestodes*. *Parasitol Res*. 1988; 74:293-296.
79. Khalifa R MNMA. Histochemical and ultrastuctural studies on the calcareous corpuscles and eggs of *Taenia taeniaeformis* and *Dipylidium caninum*. *J. Egypt. Soc. Parasitol*. 2011; 41 (2): 513-528.
80. Cortés-Motta M FGR. Osteonecrosis of the jaws: pathophysiology, diagnosis and treatment. *CES Odontologia*. 2016; 29(2 : 65-77).