

01694



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS EN EL TEGUMENTO
DE *Fasciola hepatica* COMO CONSECUENCIA DEL
TRATAMIENTO *IN VITRO* E *IN VIVO* CON UN
FASCIOLICIDA EXPERIMENTAL

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

NORMA RIVERA FERNÁNDEZ

TUTOR:
DR. FROYLÁN IBARRA VELARDE

COMITÉ TUTORAL:
DRA. TERESA FORTOUL VAN DER GOES
DR. ELISEO HERNÁNDEZ BAUMGARTEN

M346842



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A MI COMITÉ TUTORAL

DR. FROYLÁN IBARRA VELARDE
DRA. TERESA FORTOUL VAN DER GOES
DR. ELISEO HERNÁNDEZ BAUMGARTEN

A MI HONORABLE JURADO

DR. ELISEO HERNÁNDEZ BAUMGARTEN
DRA. TERESA FORTOUL VAN DER GOES
DR. ZEFERINO GARCÍA VÁZQUEZ
DR. JORGE GERMINAL CANTO
DR. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA
DRA. MARÍA TERESA QUINTERO MARTÍNEZ
DR. FROYLÁN IBARRA VELARDE

AL BIÓLOGO ARMANDO ZEPEDA RODRÍGUEZ

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

AL PROYECTO PAPIIT-DEGAPA-UNAM No IN214502-3

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Norma Rivera
Hernández

FECHA: 10/08/05

FIRMA: [Firma]

Índice

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1 Agente etiológico	3
1.2 Importancia económica de la fasciolosis	6
1.3 Distribución geográfica	7
1.4 Quimioterapia	7
1.5 Bencimidazoles	9
1.6 Triclabendazol como agente fasciolicida	12
1.7 Compuesto alfa como agente fasciolicida	13
3. Discusión	16
4. Referencias	20
5. Artículos publicados	26
Tegumental surface changes in adult <i>Fasciola hepatica</i> following treatment in vitro and in vivo with an experimental fasciolicide.	27
The effect of the 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthylloxy)-1<i>H</i>-bencimidazole on the tegument of immature <i>Fasciola hepatica</i> in their natural host.	31

Índice de Figuras

Fig. 1. Estructura del Triclabendazol	12
Fig. 2. Estructura del Compuesto alfa	14
Fig. 3. Concentración plasmática del compuesto alfa después de una administración oral de 10mg/kg en borregos	16

Índice de microfotografías de barrido

- | | |
|---|---|
| 1. Microfotografía de barrido de <i>Fasciola hepatica</i> adulta | 4 |
| 2. Microfotografía de barrido de la superficie ventral de la región media anterior de <i>Fasciola hepatica</i> adulta | 5 |
| 3. Microfotografía de barrido de <i>Fasciola hepatica</i> inmadura de tres semanas de edad | 5 |

Índice de cuadros

Cuadro 1. Fasciolicidas	9
Cuadro 2. Formulación de la suspensión del compuesto alfa	14
Cuadro 3. Solubilidad del compuesto alfa	15
Cuadro 4. Parámetros farmacocinéticos del compuesto alfa en ovinos	15

“EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS EN EL TEGUMENTO DE *Fasciola hepatica* COMO CONSECUENCIA DEL TRATAMIENTO *IN VITRO* E *IN VIVO* CON UN FASCIOLICIDA EXPERIMENTAL”

RESUMEN

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria que causa severas pérdidas económicas en el ganado y se controla comúnmente mediante el uso de compuestos químicos denominados fasciolicidas. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar los cambios morfológicos en el tegumento de *Fasciola hepatica* juvenil y adulta como consecuencia del tratamiento *in vitro* e *in vivo* con el compuesto alfa y su metabolito sulfóxido mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Las fasciolas utilizadas en el presente estudio se obtuvieron mediante la infección vía oral de borregos con metacercarias de *Fasciola hepatica*. Para los estudios *in vitro* se expusieron los parásitos adultos a 40 mg/l de sulfóxido de compuesto alfa a diferentes tiempos de incubación. En los estudios *in vivo* los borregos infectados se trataron con compuesto alfa en suspensión a la dosis de 10 mg/kg vía oral y se sacrificaron a diferentes tiempos postratamiento. Para ambos estudios se incluyeron grupos de trematodos testigos sin tratamiento. En la mayoría de los especímenes observados mediante MEB se apreció un tegumento engrosado, surcos profundos, vesículas, pérdida de espinas y exposición de la lámina basal, sobretodo en la región media posterior y región de la cola de la superficie ventral. Las lesiones fueron similares en los estudios *in vitro* e *in vivo*, salvo algunas pequeñas diferencias en severidad y frecuencia, asimismo, los cambios en el tegumento fueron más severos en las fasciolas inmaduras. Bajo las condiciones en las que se realizó el presente estudio se concluye que el tegumento de *Fasciola hepatica* juvenil y adulta es un blanco importante para que el compuesto alfa ejerza su efecto.

Palabras clave: *Fasciola hepatica*, fasciolicidas, compuesto alfa, microscopía electrónica de barrido.

ABSTRACT

Fasciolosis, a parasitological disease that causes significant economical losses, is commonly treated with chemical compounds called fasciolicides. The aim of the present study was to evaluate the tegumental surface changes in immature and adult *Fasciola hepatica* after treatment *in vitro* and *in vivo* with compound alpha and its sulphoxide metabolite. For both studies, flukes were raised in sheep infected orally with metacercariae of *F.hepatica*. For the *in vitro* studies adult flukes were exposed to 40 mg/l of alpha sulphoxide at different incubation times. For the *in vivo* studies sheep were treated orally with compound alpha at the rate of 10 mg/kg and killed at different times posttreatment. For both studies non treated controls were enclosed. The changes in the tegument were evaluated using scanning electron microscopy (SEM). In almost all the specimens evaluated by SEM the tegument appeared swollen, with deep furrows, presence of blebs, spine lost and an exposed basal lamina; these lesions were mainly observed at the posterior midbody and tail region of the ventral surface. The lesions were similar in both studies, although few differences were seen between *in vivo* and *in vitro* specimens. Immature flukes evaluated by SEM, showed more damages than adult ones. Under the conditions that this study was undertaken it is concluded that the tegument of immature and adult *Fasciola hepatica* is an important organ for compound alpha to exert its fasciolicide effect.

Key words: *Fasciola hepatica*, fasciolicides, compound alpha, liver fluke, scanning electron microscopy

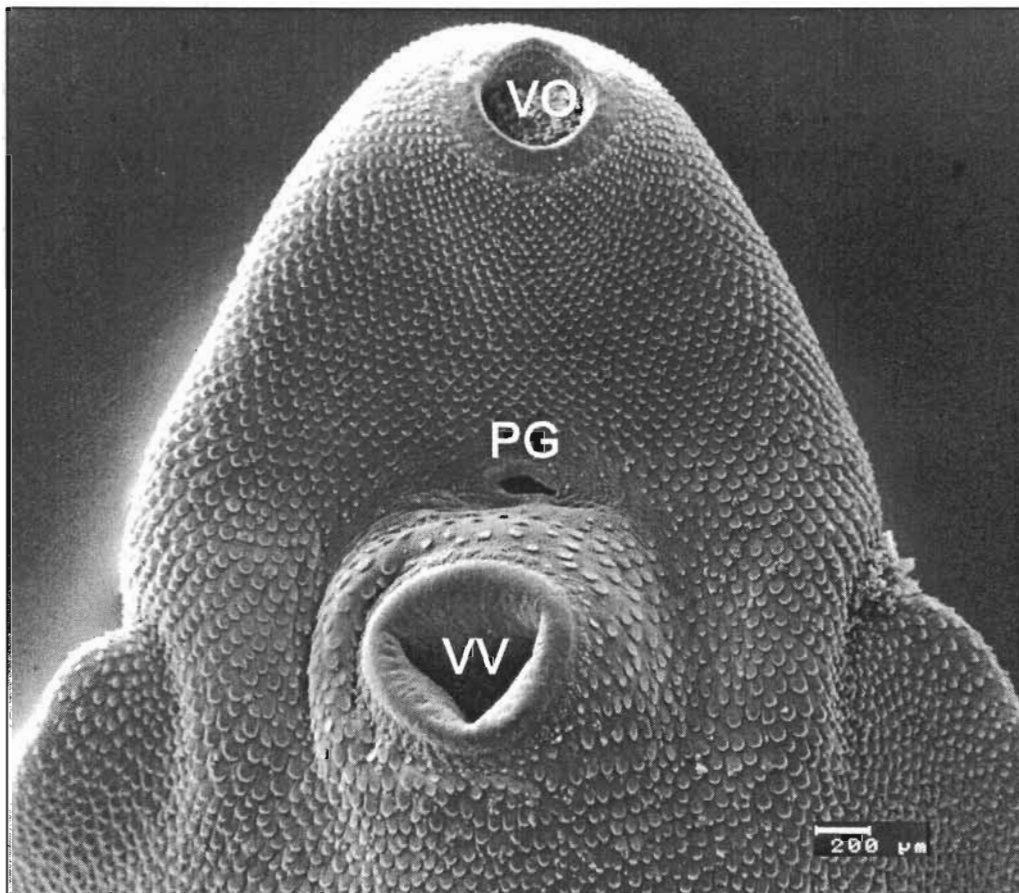
1. INTRODUCCIÓN

1.1 Agente etiológico

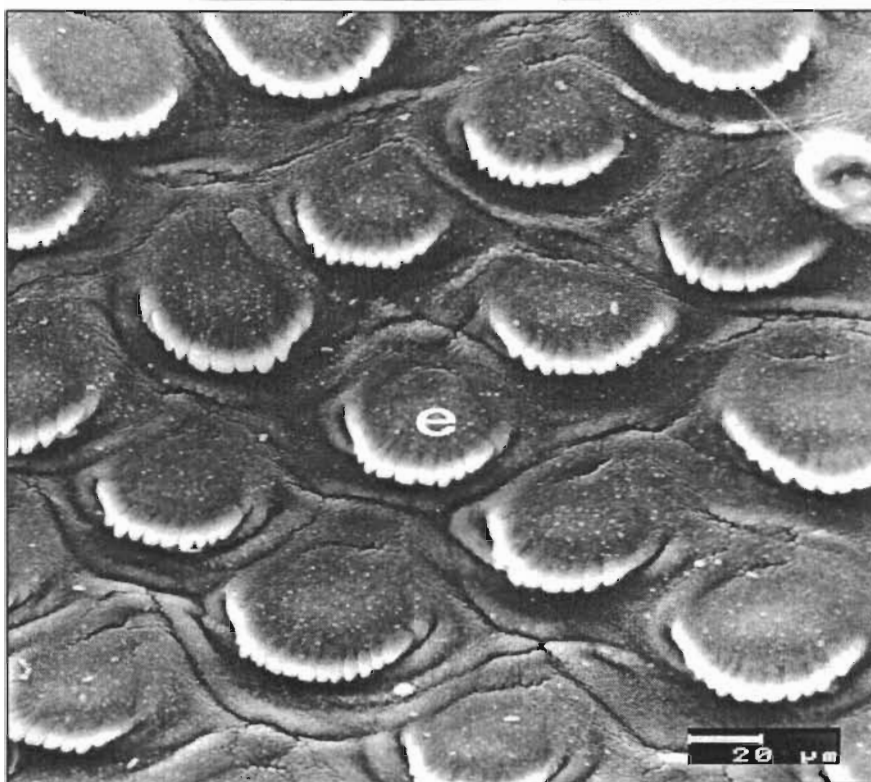
La fasciolosis es una enfermedad parasitaria que afecta a gran cantidad de animales herbívoros, omnívoros, rumiantes y ocasionalmente al hombre. Es causada por el trematodo *Fasciola hepatica*, cuya distribución geográfica corresponde a la de los huéspedes intermediarios, que son caracoles dulceacuícolas pulmonados, principalmente del género *Fossaria* (Nari y Fiel, 1984; Vera, 1994).

El trematodo adulto tiene forma de hoja y es aplanado dorsoventralmente. En el extremo anterior se localiza el cono oral conformado por la ventosa oral, ventosa ventral y poro genital, que es el conducto común para el sistema reproductor femenino y masculino, ya que se trata de un parásito hermafrodita. Las dos ventosas son los principales órganos de fijación y le sirven al trematodo para adherirse al tejido de los conductos biliares. La superficie de fasciola está completamente cubierta de espinas también aplanadas dorsoventralmente y con punta en su parte posterior. Estas espinas se encargan de mantener al parásito dentro de los conductos biliares y le ayudan a rasgar el epitelio y a puncionar vasos sanguíneos para que el parásito se alimente. Estas estructuras crecen en longitud y se vuelven multipuntiagudas a medida que el parásito se desarrolla, así, las espinas anteriores rebasan 8 veces su tamaño inicial y las posteriores hasta 24 veces (Dalton, 1999; Georgi, 1990). El número de espinas en la parte posterior se duplica de 3000 a 6000 durante la primera semana postinfección. Las espinas están firmemente adheridas a la membrana basal. Tanto en la parte ventral como en la dorsal el parásito está recubierto por tegumento, que es el sitio donde se llevan a cabo funciones bioquímicas, fisiológicas e inmunológicas entre el parásito y su huésped. Es un sincicio formado de capas protoplasmáticas, en el cual se lleva a cabo diferentes funciones: síntesis y secreción de varias sustancias, absorción de nutrientes y osmoregulación entre otras. La membrana apical se encuentra cubierta por una delgada capa de glicocálix y la membrana basal está invaginada y contiene mucopolisacáridos. En el parásito adulto el tegumento presenta 2 tipos de cuerpos secretores llamados T1 que se encuentran en la base

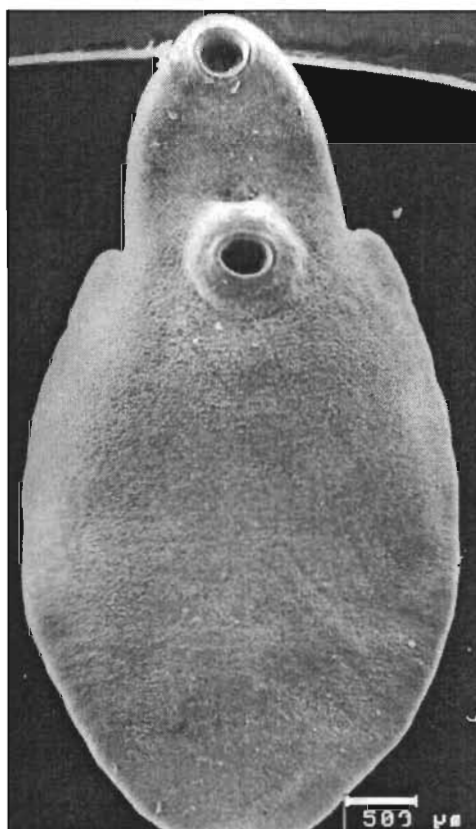
del sincicio y los T2 en el ápice del mismo. En las fasciolas recién desenquistadas se localizan los cuerpos secretores T0, los cuales cambian a T1 cuando el parásito penetra al hígado. Los cuerpos secretores tienen como función renovar la membrana apical del parásito. El citoesqueleto de *F. hepatica* puede dividirse en tres componentes: los microtúbulos (compuestos de tubulina), los microfilamentos (compuestos de actina) y los filamentos intermedios, de éstos últimos se sabe muy poco. La mayoría de los estudios de citoesqueleto se enfocan a los microtúbulos, ya que son el principal blanco de acción para los antihelmínticos bencimidazólicos. Los microtúbulos son los responsables de diversos e importantes procesos celulares como la organización, transporte y movimiento de diversos organelos (Dalton, 1999).



1. Microfotografía de barrido de *Fasciola hepatica* adulta, VO (ventosa oral), PG (poro genital), VV (ventosa ventral), barra 200 μ m.



2. Microfotografía de barrido de la superficie ventral de la región media anterior de *Fasciola hepatica* adulta, e (espina), barra 20 μ m.



3. Microfotografía de barrido de la superficie ventral de *Fasciola hepatica* inmadura de tres semanas de edad, barra 500 μ m.

1.2 Importancia económica de la fasciolosis

La importancia económica de ésta enfermedad radica en las graves pérdidas económicas que causa en la industria pecuaria, principalmente en ganado bovino y ovino de todo el mundo. Las pérdidas se dividen en directas como muerte de los animales y decomiso de hígados en el rastro e indirectas como baja de producción de leche, carne y retardo en el crecimiento. De los 36 millones de bovinos existentes en México, 18 millones están expuestos a la infección por *Fasciola hepatica*, de éstos, 6 millones se encuentran infectados, por lo que se requieren entre 12 y 15 millones de dosis de fasciolicidas por año para tratar de controlar esta parasitosis (Quiroz e Ibarra, 2000). Boray (1994) menciona que se pierden anualmente más de 200 millones de dólares a nivel mundial por concepto de fasciolicidas. En las últimas décadas se cuenta con un mayor número de casos reportados de fasciolosis en humanos en Europa, América, Asia y África (Cheng y Mott, 1991). Los focos mayores de infección provienen de animales herbívoros domésticos, los cuales están ampliamente distribuidos en el mundo. La costumbre de ingerir plantas acuáticas semisumergidas del tipo de los berros, es un factor de riesgo muy importante para adquirir la infección por *Fasciola hepatica*. Los rumiantes actúan como reservorio principal con relación al hombre. No existe evidencia de que los ovinos y cabras adquieran inmunidad contra *Fasciola hepatica*, mientras que los bovinos son resistentes al desafío después de infecciones iniciales (Smithers, 1982). Según Boray (1969), una fasciola puede producir en ovinos entre 4000 a 50000 huevos del trematodo por día y de 8800 a 25100 huevos por huésped entre las semanas 13 a 19 postinfección, de ahí que los ovinos juegan un papel importante en la contaminación de las pasturas y en la transmisión de la fasciolosis humana. La información obtenida por imágenes satelitales para saber de la distribución y prevalencia de esta zoonosis es de gran utilidad para controlar la enfermedad (Fuentes et al. 2001; Ronkni et al. 2003).

1.3 Distribución geográfica

La distribución geográfica de *F. hepatica* es mundial, principalmente en zonas templadas y subtropicales y así la enfermedad es prevalente en América del norte, Central y del Sur, Europa, Norte de Asia y África. La enfermedad también ocurre en algunas islas en las que se incluyen a Nueva Zelanda, Tasmania, Reino Unido, Islandia, Filipinas y algunas islas del Caribe (Quiroz e Ibarra, 2000). En México, los estados donde se ha encontrado una prevalencia del 73 al 100% son: Hidalgo (Ballesteros, 1995), Tabasco (Castro, 1983), Estado de México, Michoacán y Veracruz (Quiroz, 1973). La distribución de este parásito se relaciona directamente con la presencia del huésped intermediario y las condiciones ambientales favorables a éste. Gómez y Pérez, en 1978 determinaron la presencia de *Fossaria cubensis* en el Altiplano central de México, especie infectada naturalmente hasta el 100%.

En los últimos años, la incidencia de la fasciolosis se ha incrementado de manera dramática en el Reino Unido e Irlanda. En Escocia y el Norte de Inglaterra se experimentó la peor temporada de casos reportados de fasciolosis durante los años de 2002-2003 (Novartis, 2003). En el Norte de Irlanda hubo un incremento del 30% durante el otoño e invierno de 2002, (Hanna, 2003).

1.4 Quimioterapia

El control de esta enfermedad se puede llevar a cabo mediante: tratamientos químicos contra el parásito, medidas de manejo y tratamientos químicos contra el huésped intermediario (molusquicidas). En México, generalmente se utiliza el tratamiento químico contra el parásito cuando éste se encuentra dentro del huésped definitivo. Es importante saber que la patogenicidad de la fasciolosis se manifiesta más frecuentemente cuando el estado juvenil del parásito va migrando por el parénquima hepático y no cuando el verme se encuentra alojado en los conductos biliares en su estado adulto, de ahí la importancia de contar con compuestos indicados contra los estadios inmaduros tempranos del parásito.

En los últimos años, el advenimiento de fasciolicidas de mayor efectividad ha permitido la programación de tratamientos profilácticos, tendientes a evitar

totalmente la contaminación de los pastos eliminando *F. hepatica* del huésped definitivo durante el periodo prepatente (Soulsby, 1988).

El descubrimiento y posterior desarrollo de agentes químicos que puedan ser utilizados para combatir helmintos, sin causar efectos indeseables en el animal hospedador, es muy lento, complejo y requiere una inversión económica muy significativa. Desde el descubrimiento de la fenotiazina en 1938, fecha que se considera como el primer gran avance en terapia antihelmintica, mucho esfuerzo ha sido volcado en la búsqueda del fasciolicida ideal. Un fasciolicida ideal deberá reunir las siguientes propiedades: a. Índice terapéutico amplio, b. Amplio espectro, c. Activo contra estadios inmaduros y adultos, d. Que no produzca alteraciones en la vida del animal y e. Económicamente aceptable (Quiroz e Ibarra, 2000).

Con base a su estructura química, los fasciolicidas han sido divididos en los siguientes grupos (Dalton, 1999):

1. Fenoles halogenados (bitionol, hexaclorofeno, niclofolan, nitroxinil)

2. Salicilanidas (brotianide, closantel, oxiclozanida, rafoxanide).

3. Bencimidazoles (albendazol, mebendazol, triclabendazol).

4. Fenoxialquenos (Diamfenetida).

Algunos de los fármacos del último grupo poseen actividad ovicida, lo cual puede tener cierta trascendencia epidemiológica cuando los animales tratados son llevados a pastos no infectados, ya que los huevos eliminados serán probablemente estériles. Los compuestos benzimidazólicos (BZD) pueden ser clasificados de la siguiente manera:

- a) BZD tiazólicos: tiabendazol
- b) BZD metilcarbamatos: albendazol
- c) BZD halogenados: triclabendazol
- d) Pro-BZD: netobimin

A continuación se muestra un listado de varios de los compuestos que han sido utilizados contra *F. hepatica* en México en ovinos:

Cuadro 1. Fasciolicidas

Principio activo	Nombre comercial	Laboratorio	Dosis mg/kg
Triclabendazol	Fasinex	Ciba-Geigy	12 oral
Closantel	Flukiver	Janssen	5 SC
Clorsulon/ivermectina	Ivomec F	M.S.D.	2 SC
Rafoxanide	Ranide	M.S.D.	7.5 oral
Nitroxinil	Trodax	Merial	10 SC
Albendazol	Valbazen	Smith Kline	10 oral
Closantel	Zeponver	Chinoín	15 oral

1.5 Bencimidazoles

Los bencimidazoles presentan un mecanismo de acción similar. La discrepancia en cuanto a la eficacia de estos fármacos contra distintos parásitos se debe probablemente a la diferencia en la biodisponibilidad de los mismos dentro del huésped; siendo los más potentes aquellos que presentan las velocidades de absorción y eliminación más lentas (McKellar y Scout, 1990).

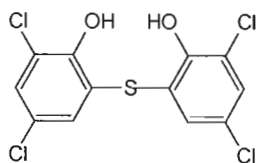
Mecanismo de acción (Fairweather y Boray, 1999; Martín, 1997):

1. Se adhieren a las moléculas de tubulina inhibiendo la formación de los microtúbulos de la pared celular del parásito, bloqueando así la división celular. El número de protofilamentos en los microtúbulos de las células de los parásitos es diferente comparado con el de las células de los mamíferos. Las células de éstos últimos contienen 13 protofilamentos en sus microtúbulos (Davis y Gull, 1983), en tanto que las células de los parásitos tienen 11, 12 y 14 protofilamentos.
2. Interfieren en el proceso metabólico alterando el sistema respiratorio (energía de síntesis) en la mitocondria. Ocasionalmente en los nematodos se disminuye la producción de ácidos orgánicos oxidados como productos finales del metabolismo; acción que probablemente se lleva a cabo cuando estos fármacos interfieren con reacciones que involucran grupos semejantes a la purina.

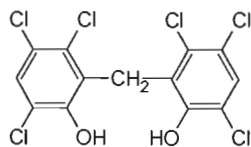
3. Inhiben el consumo de glucosa, incrementan el uso de las reservas de glucógeno e interactúan con las enzimas metabólicas de los parásitos, causando un efecto letal al producirse una disminución de adenosin trifosfato (ATP).

Los bencimidazoles tienen un metabolismo extenso en los mamíferos después de una administración oral. El compuesto precursor tiene generalmente una vida media corta y son sus metabolitos los que predominan en el plasma, los tejidos y las excretas. Estructuralmente todos los bencimidazoles antihelmínticos contienen el núcleo bencimidazólico, pero difieren en la sustitución del carbón 2 (R1) y el carbón 5 (R2). El sitio principal de biotransformación de los bencimidazoles es principalmente la fracción microsomal del hígado. Este proceso conduce a la obtención de metabolitos más polares y con menos eficacia antihelmíntica. Sin embargo, la importancia de la biotransformación de estos compuestos por los microorganismos del tracto gastrointestinal en los rumiantes ha sido poco considerada. Aunque la fracción citosólica del hígado puede también estar involucrada, el tracto gastrointestinal es el sitio principal para la formación del sulfóxido. En el hígado las reacciones de oxidación son catalizadas por dos sistemas enzimáticos, el responsable de la formación del sulfóxido es la Flavo-monooxigenasa, mientras que el responsable de la oxidación a sulfona es el citocromo-monooxigenasa, este último involucra un proceso bifásico, lento e irreversible (Gottschall et al. 1990; Vértiz, 2000; Lanusse et al. 1992; Hennessy, 1993).

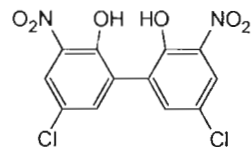
Fasciolicidas



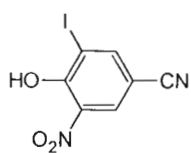
Bitionol



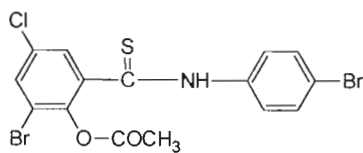
Hexaclorofeno



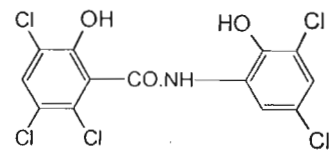
Niclofolan



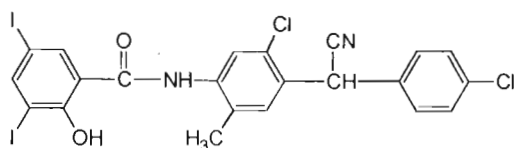
Nitroxinil



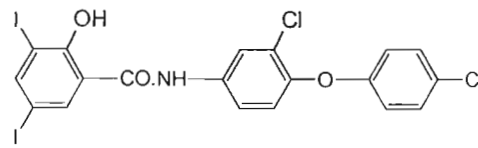
Brotianida



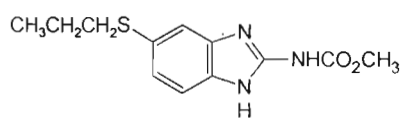
Oxiclozanida



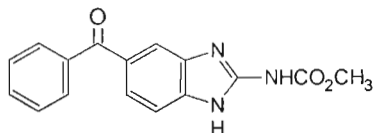
Closantel



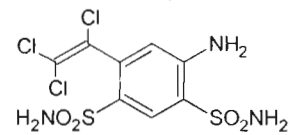
Rafoxanida



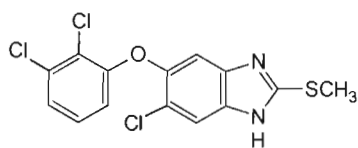
Albendazol



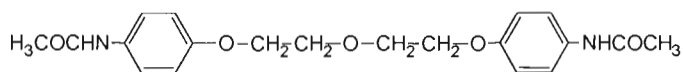
Mebendazol



Clorsulon



Triclabendazol



Diamfenetida

1.6 Triclabendazol (TCBZ) como agente fasciolicida

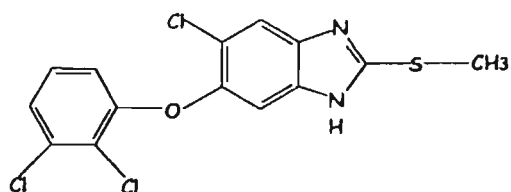


Fig. 1. Estructura del triclabendazol

Su nombre químico es 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-2-metiltio-1*H*-benzimidazol

Este fármaco es hasta la fecha el más reciente y eficaz fasciolicida contra *F. hepatica*, pero al igual que el clorsulon tiene un precio bastante elevado. En los últimos años se ha investigado en bovinos, ovinos y caprinos en Europa y EU. El TCBZ, es un derivado del benzimidazol, con olor fenólico. Interfiere con la fumarato reductasa y las funciones microtubulares, retarda la maduración del parásito y ocasiona muerte lenta. Se biotransforma en hígado y su metabolito principal es el sulfóxido, que es el que realiza la actividad fasciolicida. Tiene una buena absorción vía oral y se elimina por sangre y por leche. Estudios realizados en ovejas y cabras demuestran que la administración oral de 10 mg/Kg ocasiona una máxima concentración sanguínea de 15 ppm en 10 días. Se alcanza un nivel estable en 48 hrs y la curva de depleción tiene una vida media de 22 a 34 hrs. Mas del 95% de la dosis se elimina en heces, 2% en orina y 1% en leche. Hay residuos detectables en músculo, hígado, riñón y grasa. El periodo de eliminación es de 28 días. El triclabendazol posee una actividad específica contra fasciolas inmaduras desde una semana de edad. En ovinos, a dosis terapéuticas, es eficaz de 80 a 95% para fasciolas de 1 a 3 semanas de edad y de 4 a 12 semanas es efectivo un 95 a 100%. En bovinos, la eficacia se distribuye de la siguiente manera: 1-3 semanas, 80-95%; 4 y 5 semanas, 78-80%; 6-8 semanas, 80-95 % y de 9 semanas en adelante, 95-100%. Es bastante efectivo para tratar también *F. gigantica* (Sanyal, 1994). Al destruir fasciolas inmaduras, ayuda a restaurar parcialmente el tejido hepático y con esto la actividad enzimática (Jemil et al. 1994).

La dosis y vía de administración es de 10 mg/Kg oral para ovinos y 12 mg/Kg oral para bovinos. Tiene un margen de seguridad de 16 veces la dosis recomendada.

El triclabendazol, a diferencia de otros benzimidazoles, presenta una extensa unión a proteínas, mayor a 99% a concentraciones de 6, 9, 12, 22, y 30 mg/ml. Se une a la albúmina y es lentamente liberado en hígado, la unión no es covalente por lo que los metabolitos pueden ser fácilmente disociados por disolventes orgánicos como la acetona. Un punto importante de hacer notar con respecto a este benzimidazol es la reciente aparición de resistencia al fármaco; el primer caso de resistencia fue reportado en 1998 al tratar 6 ovinos que presentaban edema mandibular debido a *F. hepatica*, 15 días después de haber sido tratados con triclabendazol a dosis de 10 mg/Kg/oral. Se dio un segundo tratamiento y a los 7 días se encontró a la necropsia, en uno de los ovinos tratados 100 fasciolas y en los otros 5, se observó un promedio de 182 hpgh. Se repitió un tercer tratamiento y a los 9 días después, la carga parasitaria no disminuyó (Mitchell et al. 1998; Overend y Bowen, 1995). Sin duda alguna, este factor de resistencia puede afectar seriamente la permanencia futura de este fármaco en el mercado mundial.

1.7 Compuesto alfa como agente fasciolicida

Desde hace algunos años se ha estado trabajando en el diseño, síntesis y evaluación biológica de diversos compuestos con miras a evaluar la eficacia fasciolicida; reflejando así los esfuerzos de una colaboración entre el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y las Facultades de Medicina Veterinaria y Química de la UNAM (Castillo y Hernández, 1991). En un principio surgieron varios compuestos que mostraron porcentajes de eficacia considerados dentro del rango de aceptables (Ibarra et al. 1995, 1996). Posteriormente, se logró sintetizar y evaluar biológicamente la eficacia fasciolicida del denominado compuesto "alfa" (5-cloro-2-metil-6-(1-naftiloxi)-1*H*-benzimidazol) (Hernández et al. 2002). Este fármaco ha demostrado en diversos estudios porcentajes de eficacia entre el 86% hasta el 100% contra diversas edades de *F. hepatica* en ovinos (Ibarra et al. 1996, 1997, 2000; Rivera et al. 2002) y bovinos (Ibarra et al. 2004; Vera et al. 2003, 2004).

Propiedades físico-químicas del compuesto alfa (Del Rivero, 1998):

- Es un polvo blanco, cristalino, con ligero olor característico
- Su fórmula condensada es $C_{18}H_{13}ClN_2OS$
- Peso molecular de 340.86 g/mol
- Punto de fusión de 171-179°C
- pKa de 2.87, compuesto con características de base débil
- Es insoluble en agua
- Ligeramente soluble en disolventes orgánicos
- Es de carácter liposoluble
- Se metaboliza rápidamente a sulfóxido

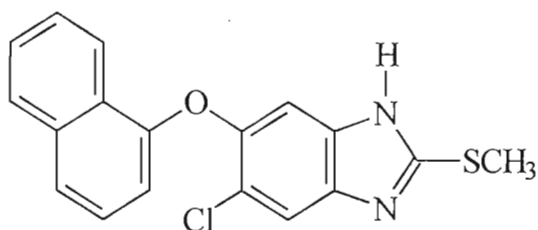


Fig. 2. Estructura del compuesto Alfa

Cuadro 2. Formulación de la suspensión del compuesto alfa
(Ibarra et al. 2000)

Pectina	0.50g
Carboximetilcelulosa de densidad media	2.50g
Carboximetilcelulosa de alta densidad	0.85g
Compuesto alfa	7.00g
Excipiente c.b.p.	100ml

En el siguiente cuadro se presenta la solubilidad del compuesto alfa a diferentes pH y disolventes:

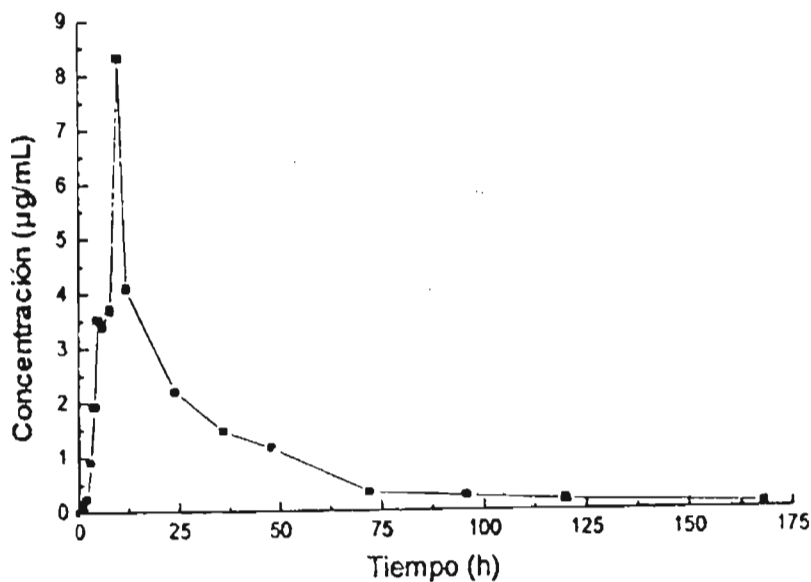
Cuadro 3. Solubilidad del compuesto alfa
(Del Rivero, 1998)

Disolvente	Solubilidad (mg/ml)
Solución amortiguadora de fosfatos pH=7.4	>0.00002
Solución amortiguadora de fosfatos pH=6.0	0.00047
Solución amortiguadora de fosfatos pH=2.2	0.00380
Solución amortiguadora de fosfatos pH=1.3	0.00620
NaOH 0.1 N	0.00032
HCl 0.1 N	0.010
Acetonitrilo	0.009
Acetona	0.038
Propilenglicol	0.041
Hexano	0.062
Metanol	0.100
Dimetil-sulfóxido	0.210

Cuadro 4. Parámetros farmacocinéticos del compuesto alfa en ovinos
(Del Rivero, 1998)

Parámetro farmacocinético	Medias
Vida media de absorción	6.17 hr
Vida media de eliminación	18.95 hr
Cmax	8.0 µg/ml
Tmax	11.4 hr
ABC	238.39 µg*h/ml
Volumen de distribución	58.57 L
Depuración	68.76 ml/min

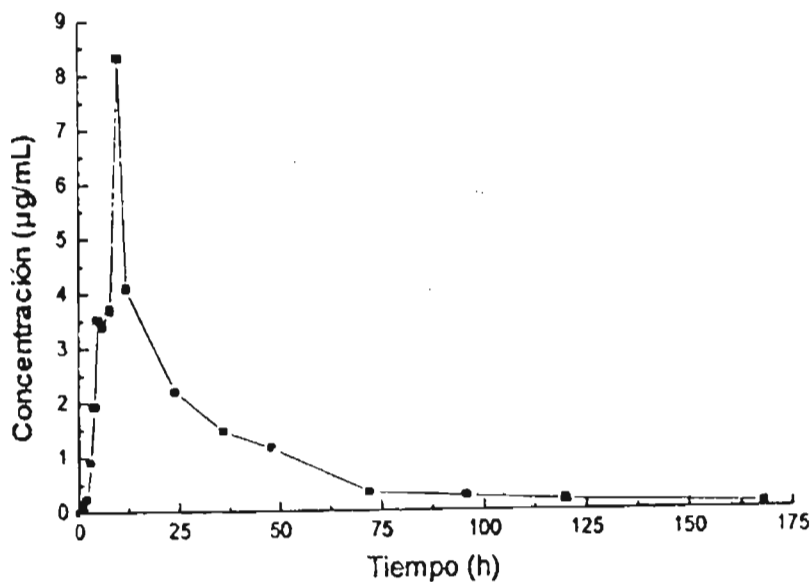
Fig.3. Concentración plasmática del compuesto alfa después de una administración oral de 10mg/kg en borregos (Del Rivero, 1998)



3. Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que el modo de acción del compuesto alfa está dirigido hacia la inhibición en la formación de microtúbulos. Se cree que la mayoría de los bencimidazoles presentan un modo de acción muy similar, estudios previos demuestran que la acción se concentra en la inhibición de la actividad mitótica (McKellar and Scout 1990), estos compuestos son efectivos contra *Fasciola hepatica* adulta a dosis elevadas (Bradley et al. 1981). La diferencia en la eficacia de los bencimidazoles en el parásito puede deberse a la estructura de los microtúbulos de las células de éstos. Algunos estudios demuestran la diferencia en el número de protofilamentos en los microtúbulos de diferentes parásitos (Davis and Gull, 1983). Por otro lado, Kohler y Bachean (1980) utilizaron extractos de tubulina de *Ascaris suum* para estudiar la unión del mebendazol y la colchicina a los microtúbulos del parásito. Así mismo Stitt y Fairweather (1994) El tegumento de fasciolas juveniles y adultas puede ser un blanco muy importante para que los fasciolicidas ejerzan su efecto, algunos de

Fig.3. Concentración plasmática del compuesto alfa después de una administración oral de 10mg/kg en borregos (Del Rivero, 1998)



3. Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que el modo de acción del compuesto alfa está dirigido hacia la inhibición en la formación de microtúbulos. Se cree que la mayoría de los bencimidazoles presentan un modo de acción muy similar, estudios previos demuestran que la acción se concentra en la inhibición de la actividad mitótica (McKellar and Scout 1990), estos compuestos son efectivos contra *Fasciola hepatica* adulta a dosis elevadas (Bradley et al. 1981). La diferencia en la eficacia de los bencimidazoles en el parásito puede deberse a la estructura de los microtúbulos de las células de éstos. Algunos estudios demuestran la diferencia en el número de protofilamentos en los microtúbulos de diferentes parásitos (Davis and Gull, 1983). Por otro lado, Kohler y Bachean (1980) utilizaron extractos de tubulina de *Ascaris suum* para estudiar la unión del mebendazol y la colchicina a los microtúbulos del parásito. Así mismo Stitt y Fairweather (1994) El tegumento de fasciolas juveniles y adultas puede ser un blanco muy importante para que los fasciolicidas ejerzan su efecto, algunos de

estos compuestos, producen cambios significativos en el tegumento como bloqueo del tránsito de los cuerpos secretores de la base al ápice del tegumento, lo que resulta en la pérdida total de este órgano a las 24 h.

La mayoría de los especímenes evaluados en estos estudios mostraron una disminución marcada de actividad a partir de las 6 horas postratamiento y postincubación, en comparación con los parásitos testigos sin tratamiento. Estos resultados coinciden con otros previamente realizados, en los cuales se evaluaron los metabolitos activos de los bencimidazoles que tienen gran relevancia en su modo de acción; por ejemplo, el albendazol produce un incremento en la motilidad del parásito antes de matarlo y el sulfóxido disminuye la actividad de éste; el triclabendazol y su metabolito activo provocan una marcada disminución en la actividad de la fasciola (Fairweather et al. 1984). Se cree que esta disminución de motilidad se debe a una hiperpolarización de la membrana del tegumento (Bennett y Kohler, 1987).

Debido al patrón de lesiones observadas en los especímenes de los presentes estudios, y debido a que 40 horas postratamiento con 10 mg/kg de compuesto alfa en ovinos se mantiene una concentración plasmática de 8.5m µg/ml, se presume que la vía de entrada del compuesto alfa al parásito sea por vía oral, ya sea por ingestión de sangre o plasma del huésped, así como también por vía intrategumental, esta última vía sobre todo en los parásitos expuestos al fármaco en condiciones *in vitro*. Reportes similares al respecto de la vía de entrada de diferentes fasciolicidas fueron hechos por diversos autores (Buchanan et al. 2003; Verheyen et al. 1982; Stitt and Fairweather 1993); sin embargo, no se pueden establecer datos certeros acerca de la vía de entrada del compuesto alfa, ya que varios factores tienen que ser tomados en cuenta, principalmente el metabolismo del fármaco en el parásito, lo cual queda por ser determinado.

La resistencia hacia los bencimidazoles es un problema mundial que va en aumento día a día, sobre todo en los nematodos (Jackson, 1993) y trematodos (Brindley, 1994; Boray et al. 1997); parece ser que la resistencia hacia los fasciolicidas se debe a un mecanismo genético, que aunado al uso indiscriminado de algunos fasciolicidas, como el triclabendazol, sobre todo en países Europeos,

ha comenzado a crear resistencia en poblaciones heterogéneas de *Fasciola hepatica* (McConville, 2004). Los mecanismos genéticos y bioquímicos involucrados en la aparición de resistencia en los helmintos son bastante complejos y no son bien conocidos; pero se plantea que varía de acuerdo a los fármacos empleados y de acuerdo con la especie que se encuentra expuesta a éstos (Eddi et al. 1996)

Se creó que el mecanismo se relaciona con la pérdida por mutación, de la afinidad por los receptores a los fármacos utilizados. Aspectos como el grado de dominancia de los heterocigotos y el potencial reproductivo de estos individuos influyen de forma determinante en el desarrollo de la resistencia (Mottier y Lanusse, 2001).

La resistencia de *F. hepatica* hacia el triclabendazol fue reportada por vez primera en Australia por Overend y Bowen en 1995 y posteriormente en Irlanda y Reino Unido (Coles et al. 2000; Mitchell et al. 1998). Hay evidencias recientes de que las cepas de *Fasciola hepatica* resistentes al triclabendazol son capaces de metabolizar más rápido el fármaco que las cepas no resistentes (Robinson et al. 2004)

A pesar de los intentos por introducir un control antiparasitario integrado, las medidas de control continúan siendo basadas, casi exclusivamente, en el tratamiento químico. La falta de integración entre medidas de manejo animal y tratamientos es un factor de alto riesgo en el desarrollo de resistencia. Queda claro entonces que el trabajo fármaco-parasitológico conjunto será crucial para proponer soluciones, que basadas en el conocimiento científico sobre el tema, puedan aportar soluciones para retardar el desarrollo de resistencia a los fármacos disponibles.

La mayoría de los fármacos fasciolicidas no son eficaces contra todas las edades de *F. hepatica*, o si lo son, la dosis tiene que aumentar para tratar estadios inmaduros de ésta y al aumentar la dosis, aumenta la toxicidad del compuesto. El triclabendazol es el único fármaco que muestra una eficacia satisfactoria contra todos los estadios de las fasciolas, pero al igual que la gran mayoría de los fasciolicidas, es un fármaco de importación. Por esta razón se considera necesario

desarrollar un compuesto fasciolicida de producción nacional, que no sea tóxico para el huésped y que sea efectivo contra todos los estadios evolutivos de *F. hepatica*, además de que sea económicamente accesible.

Los riesgos que se corren para desarrollar nuevos fármacos son enormes. De cada 10,000 sustancias que son sintetizadas y evaluadas biológicamente en un laboratorio, sólo una o dos son finalmente aprobadas. Se requiere un promedio de 12 años para el desarrollo y estudio de un fármaco nuevo. Una vez que se ha descubierto la molécula y se ha probado su eficacia, se deben de realizar pruebas de toxicidad como: DL 50%, toxicidad aguda, sub aguda y crónica, reacciones dermatológicas, carcinogenicidad, teratogenicidad y embriotoxicidad entre otras (Alva, 1997).

El modo de acción de diversos fasciolicidas ha sido estudiado anteriormente. Sin embargo, la mayoría de datos obtenidos solo sugieren que posiblemente el efecto generado por estos fármacos puede ser de tal o cual manera sin atreverse a especificar o afirmar claramente la forma en que el fasciolicida afecta o extermina al parásito (Fairweather et al. 1999).

Mediante el uso de la microscopía electrónica de barrido se ha comprobado que el compuesto alfa daña en forma importante el tegumento de *Fasciola hepatica* inmadura y adulta; sin embargo, se requieren realizar nuevos estudios para conocer el metabolismo del fármaco en el parásito, así como también la acción de éste en otros sistemas del trematodo; dichos estudios se están llevando a cabo.

Bajo las condiciones en las que se realizó la presente investigación se concluye que el compuesto alfa es un fasciolicida potencial que afecta de manera importante el tegumento de *F. hepatica*, amen de que podría ser una alternativa a futuro para resolver el problema de resistencia hacia el triclabendazol que se está experimentando en la unión Europea, así como también sería de esperar una reducción de costos por tratamientos antiparasitarios en el ganado de nuestro país al tener acceso a un fasciolicida de producción nacional.

4. Referencias

1. Alva R. The creation of new products for animal health and opportunities in research for veterinarians in the pharmaceutical industry. Merck Research Laboratories. Merck and Co; Inc; Rahway, New Jersey. USA, 1997.
2. Ballesteros RG, Guerrero MC, Vega AN, Quiroz RH. Valoración del control de *Fasciola hepatica* en vacas tratadas con triclabendazol. Memorias del XIX Congreso Nacional de Buiatría, Torreón, Coahuila, 1995.
3. Bennett JL, Kohler P. *Fasciola hepatica*: action *in vitro* of triclabendazole on immature and adult stages. Exp Parasitol 1987; 63:49-57.
4. Boray JC. Disease of domestic animals caused by flukes. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Rome, 1994.
5. Boray JC, Shuyter V, Campbell NJ, McKinnon A. Resistance of immature and adult *Fasciola hepatica* to triclabendazole in the fields. In: Proceedings of the 16th International Conference of the WAAVP, Sun City, 1997.
6. Boray JC. Experimental fasciolosis in Australia. Adv in Parasitol 1969; 7:95-210.
7. Bradley RE, Randall WF, Armstrong DA. Anthelmintic efficacy of albendazole in calves with naturally acquired *Fasciola hepatica* infection. Am J Vet Res 1981; 42:1062-1064.
8. Brindley PJ. Drug resistance to Schistosomicides and other anthelmintics of medial significance. A Trop 1994; 56: 213-231.
9. Buchanan JF, Fairweather I, Brennan GP, Truggett A, Hoey EM. *Fasciola hepatica*: surface and internal tegumental changes induce by treatment *in vitro* with the sulphoxide metabolite of albendazole (Valbazen). Parasitol 2003; 126:141-153.
10. Castillo R, Hernández A. Estudio sobre la síntesis química y actividad *in vitro* contra *F. hepatica* de algunos derivados del bencimidazol. Rev Mex de Ciencias Farmacéuticas 1991; 22:11-15.
11. Castro BV. Contribución a la epizootiología de *Fasciola hepatica* bovina en el municipio de Jalapa, Tabasco (Tesis de licenciatura). Villahermosa Tabasco,

México: Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, 1983.

12. Coles GC, Rhodes AC, Stafford KA. Activity of closantel against triclabendazole resistant *Fasciola hepatica*. *Vet Rec* 2000; 146:504-507.

13. Cheng MG, Mott KE. Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection: a review of recent literature. *Trop Dis Bull* 1991; 87:1-38.

14. Dalton JP. Fasciolosis. NY: University Press, 1999.

15. Davis C, Gull k. Protofilament number in microtubules in cells of two parasitic nematods. *J of Parasitol* 1983; 69:1094-1099.

16. Del Rivero RLM. Farmacocinética del aBioF10 en borregos (tesis maestría). México, DF. Facultad de Química. UNAM, 1998.

17. Eddi C, Caracostantogolo J, Peña M, Schapiro J, Marangunich L, Waller P J, Hansen JW. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Argentina. *Vet Parasitol* 1996; 62: 189-197.

18. Fairweather I, Boray JC. Fasciolicides: Efficacy, Actions, Resistance and its magnaments. *Vet J* 1999; 158:81-112.

19. Fairweather I, Colmes SD, Thereadgold LT. *Fasciola hepatica*: motility responses to fasciolicides in vitro. *Exp Parasitol* 1984; 57:209-224.

20. Fuentes MV, Malone JB, Mas-Coma S. Validation of mapping and prediction model for human fasciolosis transmission in Andean very high altitude endemic areas using remote sensing data. *A Trop* 2001; 79:87-95.

21. Georgi JR, Georgi ME. Parasitology for veterinarians. 5th ed. Philadelphia, USA: W.B. Saunders, 1990.

22. Gómez AT, Pérez R. Fasciolosis en México, estado actual y huéspedes intermediarios. *Rev Lat Am Microbiol* 1978; 20:121-127.

23. Gottschall DW, Theodorides VJ, Wang R. The metabolism of benzimidazole anthelmintics. *Parasitol Tod* 1990; 4:115-124.

24. Hanna B. Liver fluke explained. *Vet line Newsletter of Veterinary Sciences Division* 2003; 17:47-50.

25. Hennessy D. Pharmacokinetic disposition of benzimidazole drugs in the ruminant gastrointestinal tract. *Parasitol Tod* 1993; 9:329-333.
26. Hernández CA, Ibarra VF, Vera MY, Rivera FN, Castillo BR. Synthesis and fasciolicidal activity of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1H-benzimidazole. *Chem Pharm Bull* 2002; 50:649-652.
27. Ibarra VF, García SE, Fernández RM, Vera MY, Hernández CA, Castillo BR. Eficacia de dos compuestos de síntesis química *in vivo* e *in vitro* en ovinos. *Vet Méx* 1996; 28:4-11.
28. Ibarra VF, García SE, Vera MY, Hernández CA, Castillo BR. Eficacia fasciolicida del compuesto alfa contra estadios juveniles y adultos en ovinos. *Vet Méx* 1997; 28:4-8.
29. Ibarra VF, Vera MY, Hernández CA, Castillo BR. Eficacia de un compuesto experimental contra *Fasciola hepatica* juvenil y adulta en ganado ovino. *Vet Méx* 1996; 27:119-122.
30. Ibarra VF, Vera MY, Montenegro CN, Flores CJ, Hernández CA, Castillo BR. Evaluación de cuatro vehículos para formular un fasciolicida experimental. *Vet Méx* 2000; 31:47-51.
31. Ibarra VF, Vera MY, Olazarán JS, Hernández CA, Castillo BR. Fasciolinip-1: Eficacia fasciolicida experimental en ovinos. *Rev Lat de Microbiol* 1995; 37:171-178.
32. Ibarra VF, Vera MY, Olazarán JS, Hernández CA, Castillo BR. Fasciolinip-2: Eficacia fasciolicida experimental en ovinos. *Parasitol al día* 1995; 19:113-118.
33. Ibarra F, Vera Y, Quiroz H, Cantó J, Castillo R, Hernández A, Ochoa P. Determination of the effective dose of an experimental fasciolicide in naturally and experimentally infected cattle. *Vet Parasitol* 2004; 120:65-74.
34. Jackson F. Anthelmintics resistance. *Brit Vet J* 1993; 149:123-138.
35. Jemil MH, Gatrér P, Dorchie P, Romdhane SB. Effect of triclabendazole on the depletion of liver transformation enzymes caused by *Fasciola hepatica*. *Rev de Med Vet* 1994; 145:3-6.

36. Kohler P, Bachean R. The possible mode of action of mebendazole in *Ascaris suum*. In the host invader interplay. Ed Van den Bossche. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam 1980.
37. Lanusse CE, Nare B, Gascon LH, Pichard RK. Metabolism of albendazole and albendazole sulphoxide by ruminal and intestinal fluids of sheep and cattle. *Xenobio* 1992; 4:419-426.
38. Martin RJ. Review: modes of action of anthelmintics drugs. *The Vet J* 1997; 154:11-34.
39. McKellar QA, Scout EW. The benzimidazole agents a review. *J Vet Pharmacol Therap* 1990; 13:223-247.
40. McConville M. Evaluation of a novel benzimidazole compound against triclabendazole resistant *Fasciola hepatica*. BSc (hons), School of Biology and Biochemistry, Queen's University of Belfast, 2004.
41. Mitchell GBB, Maris L, Bonnell MA. Triclabendazole resistant liver fluke in scotish sheep. *Vet Rec* 1998; 143:14-18.
42. Mottier L, Lanusse C. Bases moleculares de la resistencia a fármacos antihelmínticos. *Rev de Med Vet* 2001; 82 (2): 74-85.
43. Nari A, Fiel C. Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención y control. Argentina: Hemisferio sur, 1984.
44. Novartis. The fluke report. On line: <http://www.endoparasites.net/site.php>. 2003.
45. Overend DJ, Bowen FL. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Aust Vet J* 1995; 72:7-12.
46. Quiroz RH, Herrera RD, Fernández CL. Valoración de la intradermoreacción en el diagnóstico de la fasciolosis. *Vet Méx* 1973; 4:236-239.
47. Quiroz RH, Ibarra VF (coordinadores académicos). Temas selectos de Parasitología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Parasitología, 2000.

48. Rivera N, Ibarra F, Olazarán S, Vera Y, Castillo R, Hernandez A. Efficacy of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1*H*-benzimidazole against different stages of *Fasciola hepatica* in pelibuey sheep. *Vet Méx* 2002; 33:55-61
49. Robinson M, Lawson J, Trudgett A, Hoey EM, Fairweather I. The competitive metabolism of triclabendazole sulphoxide by triclabendazole-susceptible and triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. *Parasitol Res* 2004; 92:205-210.
50. Ronkin MB, Massoud A, Hanilo A. Comparison of adult somatic and cysteine proteinase antigens of *Fasciola hepatica* in enzyme linked immunosorbent assay for serodiagnosis of human fasciolosis. *A Trop* 2003; 88:69-75.
51. Sanyal PK. Pharmacokinetics study of the triclabendazole in sheep and goat using a high performance liquid chromatography method. *In J Pharmacol* 1994; 18: 370-374.
52. Smithers SR. Fasciolosis and other trematode infections. *In: Immunology of parasitic infections*, 2nd edition, Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1982.
53. Soulsby E.J.L. *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos*. México, D.F.: Interamericana, 1988.
54. Stitt AW, Fairweather I. *Fasciola hepatica*: the effect of microtubule inhibitors colchicina and tubulozole-C on the structure of the adult fluke. *Parasitol* 1994; 107:297-309.
55. Stitt AW, Fairweather I. *Fasciola hepatica*: tegumental surface changes in adult and juvenile flukes following treatment in vitro with the sulphoxide metabolite of triclabendazole (Fasinex). *Parasitol Res* 1993; 79:529-536.
56. Vera MY. Comparación de la eficacia e impacto inmunológico de 2 fasciolicidas contra *F. hepatica* en borregos pelibuey infectados experimentalmente (tesis maestría). México, D.F. Facultad de Ciencias. UNAM, 1994.
57. Vera Y, Ibarra F, Liéban E, Quiroz R, Castillo R, Hernández A, Ochoa P. Efficacy of an experimental fasciolicide against immature and mature *Fasciola hepatica* in artificially infected calves. *Parasitol Res* 2004; 92:211-214.

58. Vera Y, Ibarra F, Quiroz R, Hernández A, Castillo R. Field trial on the efficacy of an experimental fasciolicide compared with some commercial compounds in naturally infected cattle. *Parasitol Res* 2003; 91:1-4.
59. Vértiz SG. Evaluación farmacocinética del α BIO10 en ganado vacuno. Tesis de Maestría en Farmacia (Biofarmacia). Facultad de Química. División de Estudios de Posgrado. UNAM. 2000.
60. Verheyen A, Vanparjis O, Van den Broeck C, Lauwers H, Thienpont D. Progressive differences in drug-susceptibility of the adult liver fluke *Fasciola hepatica* (abstract) *Parasitol* 1982; 84: li.

5. Artículos publicados

ORIGINAL PAPER

Norma Rivera · Froylán Ibarra · Armando Zepeda
Teresa Fortoul · Alicia Hernández · Rafael Castillo
Germinal Cantó

Tegumental surface changes in adult *Fasciola hepatica* following treatment in vitro and in vivo with an experimental fasciolicide

Received: 18 March 2004 / Accepted: 5 April 2004 / Published online: 25 May 2004
© Springer-Verlag 2004

Abstract Our objective was to determine by scanning electron microscopy the structural changes in the tegument of adult *Fasciola hepatica* after treatment with 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1*H*-benzimidazole, called compound alpha, and its active metabolite sulphoxide, under in vitro and in vivo conditions. For the in vitro studies, flukes from sheep were exposed to 40 mg/l of compound alpha-sulphoxide over different incubation times. Flukes for the in vivo studies were raised in sheep treated orally with compound alpha and killed at different times post-treatment. Non-treated controls were included for each time of incubation. The results showed lesions after 6 h of treatment, such as swelling and furrows. At 12 h, the spines appeared to be surrounded by the tegument. At 24 h the tegument in some areas showed an exposed basal lamina. These changes became more severe as the incubation periods of the treated flukes increased. Compound alpha exerts a significant effect on the tegument of *F. hepatica*.

Introduction

Fasciolosis, caused by *Fasciola hepatica*, is a parasitic disease of great economic importance in sheep and cattle

N. Rivera (✉) · F. Ibarra
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,
Universidad Nacional Autónoma de México,
04510 Mexico City, Mexico
E-mail: normariva@hotmail.com

A. Zepeda · T. Fortoul
Facultad de Medicina,
Universidad Nacional Autónoma de México,
04510 Mexico City, Mexico

A. Hernández · R. Castillo
Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México,
04510 Mexico City, Mexico

G. Cantó
Cenid-Fisiología INIFAP Ajuchitlán,
76270 Querétaro, Mexico

in many parts of the world (Del Campillo and Vázquez 1999). Although previous studies on the fasciolicide activity of experimental compound alpha have been reported for sheep (Vera 1994; Ibarra et al. 1996, 1997, 2000; Hernández et al. 2002; Rivera et al. 2002) and cattle (Vera et al. 2003, 2004; Ibarra et al. 2004), nothing is known about its mode of action.

The aim of the present study was to determine by scanning electron microscopy (SEM) the structural changes in the tegument of adult *F. hepatica* after treatment with compound alpha and its metabolite sulphoxide (alpha-sx) under in vitro and in vivo conditions.

Materials and methods

The synthesis and formulation of compound alpha were carried out as previously described by Hernández et al. (2002) and Ibarra et al. (2000), respectively.

In vitro studies

Two pelibuey, fluke-free, 1-year-old male sheep were used. On day 0, both sheep were infected with 250 metacercariae of *F. hepatica* obtained from an infection of *Lymnaea cubensis* snails under laboratory conditions using the method described by Vera (1994). At 12 weeks after infection, the animals were killed in order to collect the flukes from the liver, which were then transported to the parasitology laboratory in thermos flasks containing RPMI-1640 (SIGMA) culture medium at 37°C, as well as antibiotics (penicillin, 50 IU/ml, streptomycin 50 mg/ml and 50% bovine serum). Next, using a laminar flow cabinet, the flukes were washed in several changes of warm (37°C) sterile RPMI-1640 with the same components as mentioned above. Using the method described by Ibarra and Jenkins (1984), six groups of eight flukes each were formed. Three groups were incubated respectively for 6, 12 and 24 h in a fresh culture medium containing compound alpha-sx at a concentration of

40 mg/l. The other three groups remained as untreated controls for each incubation time. Zero hour controls were fixed at the initial washing. For SEM, the flukes were fixed for 24 h in 4% glutaraldehyde in 0.1 cacodylate buffer, pH 7.2 and for 1.5 h in 2% osmium tetroxide. They were then washed five times in a cacodylate buffer, dehydrated through acetone, critical point dried in carbon dioxide, fixed to aluminum stubs and coated with gold in a SEM coating system 11-Hd Polaroid. The flukes were viewed with a Zeiss DSM-950 scanning electron microscope.

In vivo studies

Nine pelibuey, free-fluke, 1-year-old male sheep were infected as described above. At 12 weeks post-infection a coprologic examination was performed using the sedimentation test (Ministry of Agriculture Fisheries and Food 1988) to determine the presence of *F. hepatica* eggs. Three groups of three animals each were formed. Two sheep from each group were treated orally with a single dose of 10 mg/kg of compound alpha formulated as a 10% suspension. The third animal of each group remained as an untreated control. In order to collect the flukes from the liver, the animals were killed at 6, 12 and 24 h post-treatment, respectively. The flukes obtained were repeatedly washed in prewarmed (37°C) RPMI-1640 culture medium and fixed by the method described for the in vitro studies. Eight flukes from each group were evaluated by SEM.

Results

In vitro SEM evaluations

Observations made on adult flukes exposed to 40 mg/l of compound alpha-sx for 6, 12 and 24 h incubation were recorded as follows in almost all of the specimens examined.

After 6 h of incubation

Some lesions and blebbing were observed around the oral suckers. On the dorsal surface, the tegument presented an almost normal appearance without evident lesions. At higher magnification of the ventral mid-body region, the tegument was swollen and showed some furrowing (Fig. 1). Almost all of the spines of the ventral mid-body region were surrounded by the tegument.

After 12 h of incubation

Deep furrows were observed on both surfaces, more towards the oral cone region, and the debris of spines and blebs of different sizes and forms were seen in the ventral mid-body region (Fig. 2). In some areas the

tegument was broken and flaky; blebbing was more severe on the ventral surface than on the dorsal one.

After 24 h of incubation

Disrupted, swollen and pitted tegument was observed in different regions of both surfaces, including most of the ventral mid-body and posterior region. Similar lesions were observed on the dorsal surface. In other areas of the parasite, the smooth tegument seemed to be breaking off, mostly on the ventral surface of the mid-body region (Fig. 3) and the posterior region.

In vivo SEM evaluations

Data on adult flukes from sheep treated orally with 10 mg/kg of compound alpha and recovered at 6, 12 and 24 h were as follows in almost all of the specimens examined.

After 6 h of treatment

In a number of the specimens examined, the appearance was almost normal except for a slight disorganization of the lateral margins of the ventral surface. The spines of the ventral and dorsal surface mid-body regions and tail were well distributed. At high magnification of the ventral surface mid-body region, the tegument was swollen with some superficial fissures between the spines (Fig. 4). The spines were attached to the base and projected normally to the surface.

After 12 h of treatment

The tegument of the oral cone and ventral mid-body region was swollen in almost all the specimens examined. At the lateral margins of both surfaces, a severe disorganization was observed. At high magnification of the ventral mid-body region, the spines were submerged in the tegument leaving only the tips free (Fig. 5). This same lesion was observed in the ventral tail region; it was less severe on the dorsal surface.

After 24 h of treatment

Both surfaces of the flukes showed deep furrows in the tegument, particularly over the oral cone region. The surface of this region appeared roughened and swollen, spineless zones being seen on both surfaces of the parasite, especially in the mid-body and in the tail regions. On the ventral surface mid-body region, the tegument was smooth in some areas while other areas had no tegument and only the basal lamina was observed (Fig. 6).

All controls had a normal appearance with no alteration in their structures.

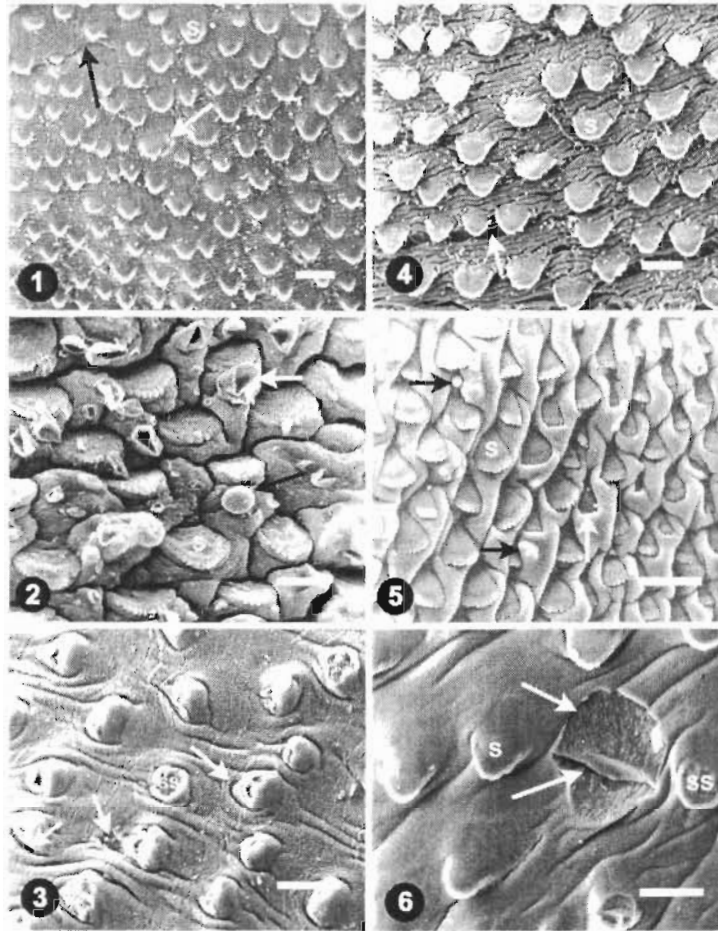


Fig. 1 An SEM at 6 h incubation of the ventral mid-body region showing a swollen tegument, areas of blebbing (white arrow) and fissures (black arrow). s Spine. Bar 50 μ m

Fig. 2 The ventral mid-body region after 12 h incubation showing blebbing. Some blebs are rounded (black arrow), others are irregular and flattened (white arrow). s Spine. Bar 10 μ m

Fig. 3 The ventral mid-body region after 12 h incubation. In some areas the tegument appears to be breaking off (white arrow), s Spine socket. Bar 20 μ m

Fig. 4 An SEM at 6 h treatment showing the ventral mid-body region. The tegument appears swollen, flaky and with furrows (white arrow). s Spine. Bar 50 μ m

Fig. 5 The ventral mid-body region after 12 h treatment. The tegument is swollen, with some blebs (black arrows), deep holes (white arrow) and the spines are surrounded by the tegument. s Spine. Bar 20 μ m

Fig. 6 The ventral surface of the mid-body region after 24 h treatment showing a smooth surface and in some areas the tegument lifting away leaving the basal lamina exposed (white arrow). s Spine, ss spine socket. Bar 20 μ m

Discussion

SEM has been used to evaluate the efficacy of many fasciolicides (Anderson and Fairweather 1998; Buchanan et al. 2002; Meaney et al. 2002, 2003) because it is a suitable technique for observing the damaged surface of the fluke tegument which carries out different mechanical and metabolic functions for the parasite (Dalton 1999).

The present study has shown the lesions that compound alpha causes to the tegument of adult *F. hepatica*. These lesions increased progressively as the incubation period of treated flukes increased, being similar in the specimens from both the *in vitro* and *in vivo* studies, although small differences were observed between the

lesions in these studies. The ventral surfaces showed more damage than the dorsal ones, with even more being seen in the mid-body and posterior regions. The reasons for these regional differences are unclear, but may be related to developmental changes in the tegument (Anderson and Fairweather 1998). Blebbing was more severe in the in vitro studies than in the in vivo, which may be due to the fact that the fluke is in more direct contact with the drug in the in vitro studies (V.F. Ibarra, personal communication). In in vitro exposure, it may be a reduction or cessation of feeding that restricts drug uptake to the tegument (Meaney et al. 2003). Another reason could be that compound alpha penetrates the parasite more rapidly in the host than compound alpha-sx, but the accumulation of the sulphoxide in the fluke tissues may be more pronounced. These results are similar to those obtained by Bennett and Kohler (1987). Fairweather et al. (1987) mentioned that diamphenetide causes blebs increasing in size, which then burst causing the loss of spines, lesions and eventual sloughing of the tegument. Blebbing has also been observed with other anthelmintic drugs. It is believed to be caused by a calcium-dependent process and represents a reaction to stress (Dalton 1999).

The results obtained in this study agree with those reported in other studies on the effects of benzimidazoles (Stitt and Fairweather 1993; Meaney et al. 2004). It is evident that the tegument of *F. hepatica* is highly susceptible to compound alpha and, more specifically, to its active metabolite alpha-sx. The lesions caused to the parasite indicate that the life of the fluke is at risk, and that the bile and other substances in the host are freely exposed. Although the modes of action of different fasciolicides have been studied previously (Fairweather and Boray 1999), the results obtained do not reveal the exact way in which the drug kills the parasite, but it seems that drug metabolism by the host and the parasite may be an important factor; this, however, remains to be determined by future studies.

In summary, tegumental swelling, blebbing and spine loss are lesions that are also found in other fasciolicides (Stitt and Fairweather 1994). The tegument of *F. hepatica* might be a fasciolicide target organ for compounds alpha and alpha-sx.

Acknowledgements The authors thank Francisco Pasos Nájera for his technical assistance. This study was supported by the project PAPIIT-DEGAPA-UNAM No IN214502-3. It study complies with the current laws of Mexico.

References

- Anderson HR, Fairweather I (1998) *Fasciola hepatica*: scanning electron microscopic evaluation of juvenile flukes following treatment in vitro with deacetylated (amine) metabolite of diamphenetide (damd). *Int J Parasitol* 18:827-837
- Bennett JL, Kohler P (1987) *Fasciola hepatica*: action in vitro of triclabendazole on immature and adult stages. *Exp Parasitol* 63:49-57
- Buchanan JF, Fairweather I, Brennan GP, Trudgett A, Hoey EM (2002) *Fasciola hepatica*: surface and tegumental changes induced by treatment in vitro with the sulphoxide metabolite of albendazole (valbazen). *Parasitology* 126:141-153
- Dalton JP (1999) Fasciolosis. University Press, New York
- Del Campillo C, Vázquez R (1999) Parasitología veterinaria. McGraw-Hill Interamericana, Madrid
- Fairweather I, Boray JC (1999) Fasciolicides: efficacy, actions, resistance and its management. *Vet J* 158:81-112
- Fairweather I, Anderson HR, Baldwin TMA (1987) *Fasciola hepatica*: tegumental surface alterations following treatment in vitro with the deacetylated (amine) metabolite of diamphenetide. *Parasitol Res* 73:99-106
- Hernández A, Ibarra F, Vera Y, Rivera N, Castillo R (2002) Synthesis and fasciolicidal activity of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthyl)-1H-benzimidazole. *Chem Pharm Bull* 50:649-652
- Ibarra VF, Jenkins DC (1984) An in vitro screen for new fasciolicidal agents. *Z Parasitenkd* 70:655-661
- Ibarra VF, Vera MY, Hernández CA, Castillo BR (1996) Eficacia de un compuesto experimental contra *Fasciola hepatica* juvenil y adulta en ganado ovino. *Vet Méx* 27:119-122
- Ibarra VF, García SE, Vera MY, Hernández CA, Castillo BR (1997) Eficacia fasciolicida del compuesto alfa contra estadios juveniles y adultos en ovinos. *Vet Méx* 28:4-8
- Ibarra VF, Vera MY, Montenegro CN, Flores CJ, Hernández CA, Castillo BR (2000) Evaluación de cuatro vehículos para formular un fasciolicida experimental. *Vet Méx* 31:47-51
- Ibarra F, Vera Y, Quiroz H, Cantó J, Castillo R, Hernández A, Ochoa P (2004) Determination of the effective dose of an experimental fasciolicide in naturally and experimentally infected cattle. *Vet Parasitol* 12:65-74
- Meaney M, Fairweather I, Brennan GP, Ramasamy P, Subramanian PB (2002) *Fasciola gigantica*: tegumental surface alterations following treatment in vitro with the sulphoxide metabolite of triclabendazole. *Parasitol Res* 88:315-325
- Meaney M, Fairweather I, Brennan GP, McDowell LSL, Forbes AB (2003) *Fasciola hepatica*: effects of the fasciolicide clorsulon in vitro and in vivo on the tegumental surface, and a comparison of the effects on young and old mature flukes. *Parasitol Res* 91:238-250
- Meaney M, Fairweather I, Brennan GP, Forbes AB (2004) Transmission electron microscope study of the ultrastructural changes induced in the tegument and gut of *Fasciola hepatica* following in vivo drug treatment with clorsulon. *Parasitol Res* 92:232-241
- Ministry of Agriculture Fisheries and Food (1988) Manual of veterinary parasitological laboratory techniques, 3rd edn. Ministry of Agriculture Fisheries and Food, London
- Rivera N, Ibarra F, Olazarán S, Vera Y, Castillo R, Hernández A (2002) Efficacy of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthyl)-1H-benzimidazole against different stages of *Fasciola hepatica* in pelibuey sheep. *Vet Méx* 33:55-61
- Stitt AW, Fairweather I (1993) *Fasciola hepatica*: the effect of microtubule inhibitors colchicine and tubulazole-C on the structure of the adult fluke. *Parasitology* 107:297-309
- Stitt AW, Fairweather I (1994) The effect of the sulphoxide metabolite of triclabendazole (Fasinex) on the tegument of mature and immature stages of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 108:555-567
- Vera MY (1994) Comparación de la eficacia e impacto inmunológico de 2 fasciolicidas contra *F. hepatica* en borregos pelibuey infectados experimentalmente. Masters thesis, National Autonomous University of Mexico, Mexico City
- Vera MY, Ibarra VF, Quiroz RH, Hernández CA, Castillo R (2003) Field trial on the efficacy of an experimental fasciolicide compared with some commercial compounds in naturally infected cattle. *Parasitol Res* 91:1-4
- Vera MY, Ibarra VF, Liebano WE, Quiroz RH, Castillo BR, Hernández CA, Ochoa GP (2004) Efficacy of an experimental fasciolicide against immature and mature *Fasciola hepatica* in artificially infected calves. *Parasitol Res* 92:211-214

Norma Rivera · Froylán Ibarra · Armando Zepeda
Teresa Fortoul · Germinal Cantó · Alicia Hernández
Rafael Castillo

The effect of the 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)- 1*H*-benzimidazole on the tegument of immature *Fasciola hepatica* in their natural host

Received: 26 November 2004 / Accepted: 20 December 2004 / Published online: 25 February 2005
© Springer-Verlag 2005

Abstract The damage to the tegument of 3-week-old *Fasciola hepatica* was evaluated by scanning electron microscopy (SEM) following treatment with the 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1*H*-benzimidazole (called compound alpha) in its natural host. For the present study, flukes were raised in pelibuey sheep infected orally with metacercariae of *F. hepatica*; the parasites were recovered from the liver of the sacrificed sheep after 6, 12 and 24 h of treatment with compound alpha. At 6 h of treatment, the flukes showed some lesions on the ventral surface of the anterior region, such as a swollen tegument and blebs. At 12 h after treatment, the specimens showed structural disorganization and spine loss in the ventral anterior region. The tegument of the flukes treated for 24 h was completely lost in some areas of the ventral surface, leaving an exposed basal lamina. The tegument of immature *F. hepatica* might be a target organ for compound alpha to exert its fasciolicide effect.

Introduction

Several clinical syndromes may be associated with liver fluke infection, depending on the number and stage of

development of the parasite. Acute fasciolosis occurs during the invasion of the liver by immature flukes. The trauma is inflicted by earlier stages of the parasites burrowing into the parenchyma and causing inflammatory reactions resulting in fatal clinical illness (Del Campillo and Vazquez 1999). Most fasciolicides show activity only against adult flukes when the damage to the liver is already done (Dalton 1999). The aim of the present study was to evaluate by SEM the damage to the tegument of 3-week-old *Fasciola hepatica* after treatment with the 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1*H*-benzimidazole, called compound alpha, in their natural host.

Materials and methods

Six pelibuey fluke-free, 1-year-old male sheep were bought at the University of Querétaro, Mexico, where fasciolosis is not present because of soil conditions and epidemiological factors. Compound alpha was used and synthesized according to the manufacturer's instructions (Hernández et al. 2002). On day 0, sheep were infected with 250 metacercariae of *F. hepatica* obtained by the infection of *Lymnaea cubensis* snails under laboratory conditions using the method described by Vera (1994). At 3 weeks after infection, all animals were found positive for *F. hepatica* by the indirect ELISA test (ELISA cut-off point 0.05) (Ibarra et al. 1998). Then sheep were ear tagged and blocked into three groups of two animals each. One animal of each group was orally treated with a 10 mg/kg single dose of 10% suspension of compound alpha; the second animal of each group remained as an untreated control. Sheep were sacrificed as follows: the first group after 6 h of treatment, the second group after 12 h of treatment, and the last group after 24 h of treatment. Five flukes from each liver of the dead animals were collected then washed in several changes of warm (37°C) sterile RPMI-1640 and fixed immediately for 24 h in 4% glutaraldehyde in 0.1 cacodylate buffer, pH 7.2, then fixed for 1.5 h in 2% osmium tetroxide and

N. Rivera · F. Ibarra (✉)
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,
Universidad Nacional Autónoma de México,
04510 Mexico City, Mexico
E-mail: ibarraf@servidor.unam.mx

A. Zepeda · T. Fortoul
Facultad de Medicina, Universidad Nacional
Autónoma de México, 04510 México City, Mexico

G. Cantó
Cenid-Fisiología INIFAP Ajuchitlán,
76270 Querétaro, Mexico

A. Hernández · R. Castillo
Facultad de Química, Universidad Nacional
Autónoma de México, 04510 Mexico City, Mexico

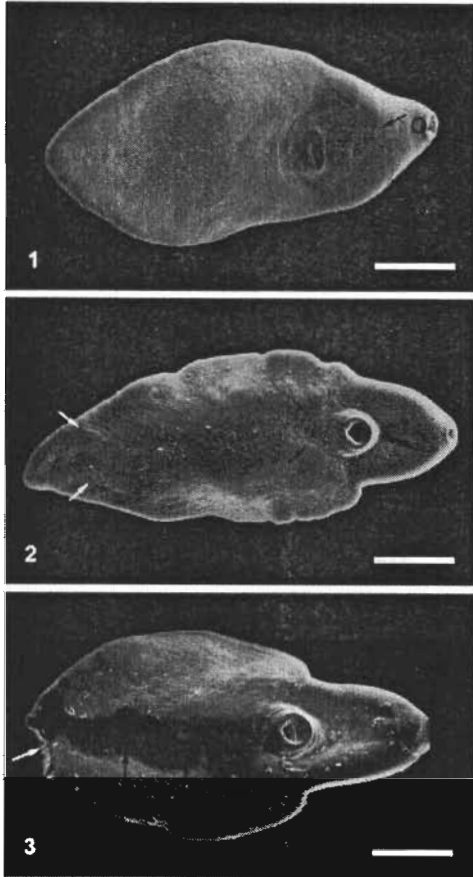


Fig. 1 *Fasciola hepatica*: 3-week-old fluke, 6 h treatment with compound alpha. SEM showing some lesions at the anterior region of the ventral surface (arrows); O oral sucker, V ventral sucker. Bar 500 μ m

Fig. 2 *F. hepatica*: 3-week-old fluke, 12 h treatment with compound alpha. SEM of whole fluke, ventral surface that showed a pitted tegument (black arrows) and evident disorganization beneath the ventral sucker. The tegument of the tail region appeared swollen (white arrows). Bar 500 μ m

Fig. 3 *F. hepatica*: 3-week-old fluke, 24 h treatment with compound alpha. SEM showing extensive loss of tegument at the ventral surface of the fluke (black arrows) and absence of the tail (white arrow) due to the severe damage. Bar 500 μ m

washed five times in a cacodylate buffer, dehydrated through acetone, critical point dried in carbon dioxide, fixed to aluminum stubs and coated with gold in an SEM coating system 11-Hd Polaroid. Flukes were viewed with a Zeiss DSM-950 scanning electron microscope.

Results

Flukes treated for 6 h

Figures 1, 2 and 3 show 3-week-old *F. hepatica* flukes after 6, 12 and 14 h treatment, respectively. In almost all specimens evaluated, both surfaces showed a normal appearance, mild disruption was observed and a few small lesions could be seen in the oral cone region (Fig. 1). At high magnification, the tegument around the ventral sucker appeared to be swollen (Fig. 4), and with some deep furrows, some blebs could be seen at the surface. At the midbody region of the ventral surface, the apical membrane had been removed (Fig. 5), some spineless zones were seen and the remaining spines appeared sunken due to the swelling of the tegument. The dorsal surface of almost all the flukes was less severely affected.

Flukes treated for 12 h

The disruption in the half oral cone region of the ventral surface was evident in almost all evaluated flukes. Disorganization was seen around the ventral sucker where spineless zones were observed (Fig. 2); this lesion extended beyond the oral cone region. The posterior ventral surface region showed an extremely swollen tegument. At high magnification, severe swelling of the tegument was observed around the oral cone region and many blebs could be seen, as well as cytoplasmic debris (Fig. 6). At the ventral surface anterior midbody region, the spines were removed, leaving the spine sockets empty (Fig. 7). The lesions seen on the dorsal surface were similar to those observed on the ventral one, being more obvious at the lateral margins and tail region.

Flukes treated for 24 h

All flukes presented lesions on both surfaces; on the ventral surface a central band showed the absence of tegument and an exposed basal lamina (Fig. 3); the damage was so severe that the tail of the fluke had broken off. At high magnification, some flat blebs and an exposed basal lamina around the ventral sucker were seen (Fig. 8). In some areas of the ventral surface midbody region, the tegument was sloughed off and appeared pitted due to the loss of spines (Fig. 9). Over the dorsal surface, an extensive loss of tegument was seen, more so over the tail region.

Both surfaces of each specimen were assessed; all controls showed no alterations to structures.

Discussion

Using scanning electron microscopy, the present study shows how compound alpha affects the tegument

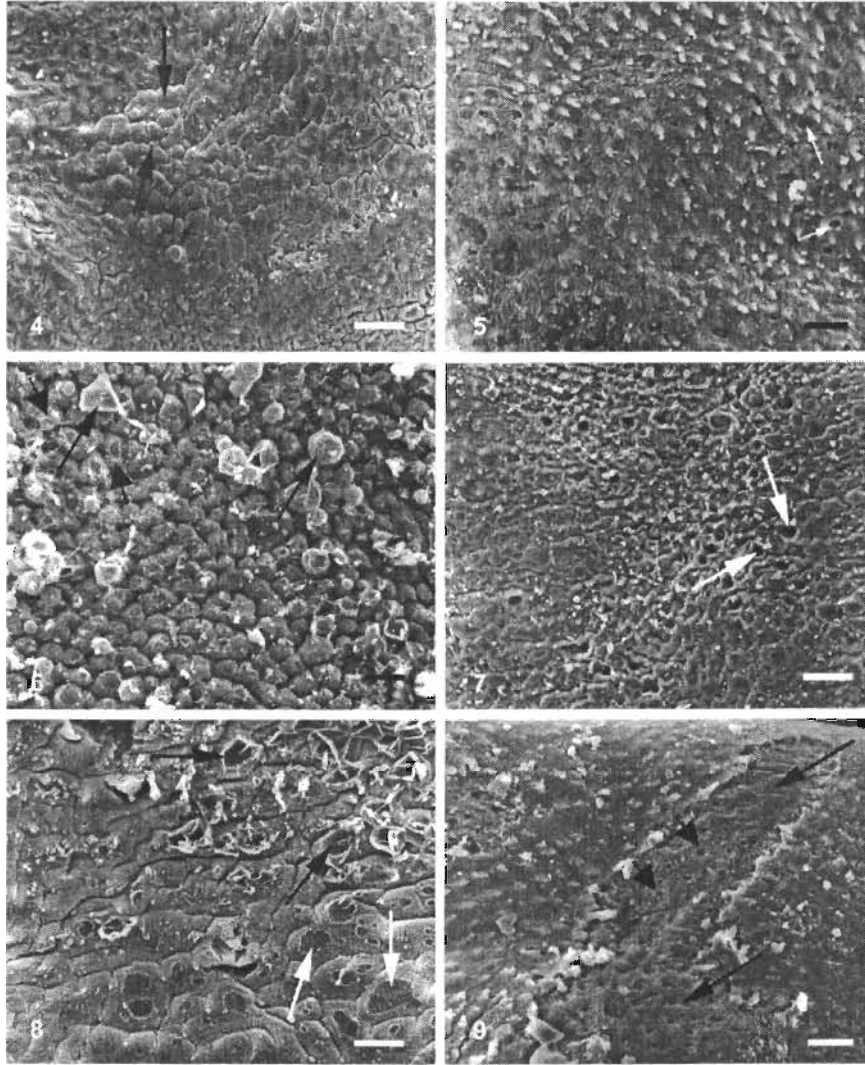


Fig. 4 *F. hepatica*: 3-week-old fluke, 6 h treatment with compound alpha. SEM of the ventral surface oral cone region that shows a severe disruption of the tegument taking the form of swelling and roughness (*large arrows*), some blebs can be seen (*small arrows*). Bar 50µm

Fig. 5 *F. hepatica*: 3-week-old fluke, 6 h treatment with compound alpha. SEM of ventral surface midbody region showing a flaky tegument (*white arrows*). Some spines can still be seen (*black arrows*). Bar 20µm

Fig. 6 *F. hepatica*: 3-week-old fluke, 12 h treatment with compound alpha. SEM of the ventral surface oral cone region showing blebs (*large arrows*) and cytoplasmic debris (*small arrows*). Bar 20µm

Fig. 7 *F. hepatica*: 3-week-old fluke, 12 h treatment with compound alpha. SEM of the ventral surface midbody region showing spine sockets (*arrows*) due to a considerable loss of spines. Bar 50µm

Fig. 8 *F. hepatica*: 3-week-old fluke, 24 h treatment with compound alpha. SEM of the ventral surface oral cone region where an absence of tegument can be seen over almost the entire surface (*white arrows*), as well as flat blebs (*black arrows*). Bar 20µm

Fig. 9 *F. hepatica*: 3-week-old fluke, 24 h treatment with compound alpha. SEM of the ventral surface midbody region showing a zone where the tegument had been sloughed off (*large arrows*), leaving empty spine sockets (*small arrows*). Bar 20µm

of 3-week-old *F. hepatica*. This technique has been used before to evaluate different flukicides (Fairweather et al. 1987; Meaney et al. 2003). Compound alpha treatment of juvenile flukes leads to damage such as swollen tegument and spine loss; both types of damage become more severe with longer treatment times. The results will be discussed in relation to a previous study on the efficacy of compound alpha in adult flukes, in which severe disruption of the specimens could not be seen until 24 h of treatment (Rivera et al. 2004). In the present study, immature flukes showed initial disruption after 6 h of treatment and substantial disruption after 24 h of treatment. The ventral surface oral cone and posterior region seem to be most affected. Compound alpha binds to approximately 97% of plasma proteins (Del Rivero 1998), which might make it possible to use the drug for oral ingestion to induce damage around the ventral sucker. Anterior damage may be due to high concentrations of the drug in the anterior half of the fluke, and posterior damage could be attributed to a concentration of compound alpha in the posterior region of the gut as Verheyen et al. observed in 1982. The swollen appearance of 3-week-old flukes may be due to the breaking of the basal infolds, concurring with the results of Anderson and Fairweather (1988). Some aspects of the disruption were more severe in juvenile flukes, such as blebbing degree, severity of swelling and spine and tegument lost, agreeing with the results of Bennet and Kohler (1987) and Stitt and Fairweather (1994). By comparison, a flaky tegument on the adult fluke was observed until 24 h of treatment in a previous study carried out by Rivera et al. (2004). Previous in vivo studies have shown that compound alpha is a highly effective fasciolicide, being active against different stages of *F. hepatica* in sheep and cattle (Rivera et al. 2002; Ibarra et al. 2004). In recent studies, McConville (2004) showed that this novel fasciolicide is effective against triclabendazole-resistant flukes from the north of Ireland. We observed that the tegument of the juvenile flukes appeared to be more severely affected than the tegument of the adults. This may be due to the fact that immature flukes are in more direct contact with compound alpha while feeding and tunneling into the liver. The severity of the lesions found in the present study may have been due to the furrows in the basal lamina allowing bile to reach the underlying tissues. As with other fasciolicides (Fairweather and Boray 1999), the results obtained in this study do not reveal exactly how the compound kills the parasite.

The severe damage induced to the surface of 3-week-old *F. hepatica* by compound alpha suggests that this novel fasciolicide disrupts the cytoplasmic microtubules of the flukes, probably by the inhibition of the movement of the tegument secretory bodies from the tegumental cells to the apical surface of the tegument. More studies are underway to confirm this.

Acknowledgements This research was supported by the project PAPIIT-DEGAPA-UNAM No. IN214502-3. The authors would like to thank Francisco Pasos Najera for expert photographic assistance. This study complies with the current laws of Mexico.

References

- Anderson HR, Fairweather I (1988) *Fasciola hepatica*: scanning electron microscopic observations of juvenile flukes following treatment in vitro with the deacetylated (AMINE) metabolite of diamphenetide (DAMD). *Int J Parasitol* 18:822-837
- Bennett JL, Kohler P (1987) *Fasciola hepatica*: action in vitro against triclabendazole on immature and adult stages. *Exp Parasitol* 63:49-57
- Dalton JP (1999) Fasciolosis. University Press, New York
- Del Campillo C, Vazquez R (1999) Parasitología Veterinaria. McGraw-Hill Interamericana, Madrid
- Del Rivero LM (1998) Farmacocinética del Alfa-Biol-10 en borregos. MSc thesis, Faculty of Chemistry, National Autonomous University of Mexico, Mexico City
- Fairweather I, Boray JC (1999) Fasciolicides efficacy, actions, resistance and its management. *Vet J* 158:81-112
- Fairweather I, Anderson HR, Baldwin TMA (1987) *Fasciola hepatica*: tegumental surface alterations following treatment in vitro with deacetylated (amine) metabolite of diamphenetide. *Parasitol Res* 73:99-106
- Hernandez A, Ibarra F, Vera Y, Rivera N, Castillo R (2002) Synthesis and fasciolicidal activity of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1*H*-benzimidazole. *Chem Pharm Bull* 50:649-652
- Ibarra F, Montenegro N, Vera Y, Boulard C, Quiroz H, Flores J, Ochoa P (1998) Comparison of three ELISA test for seroepidemiology of bovine fasciolosis. *Vet Parasitol* 77:229-236
- Ibarra VF, Vera MY, Quiroz RH, Canto GJ, Castillo R, Hernandez A, Ochoa P (2004) Determination of the effective dose of an experimental fasciolicide in naturally and experimentally infected cattle. *Vet Parasitol* 12:65-74
- McConville M (2004) Evaluation of a novel benzimidazole compound against triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. BSc (hons). School of Biology and Biochemistry, Queen's University of Belfast, Belfast
- Meaney M, Fairweather I, Brennan GP, McDowell LSL, Forbes AB (2003) *Fasciola hepatica*: effects of the fasciolicide clorsulon in vitro and in vivo on the tegumental surface, and a comparison of the effects on young and old-mature flukes. *Parasitol Res* 91:238-250
- Rivera N, Ibarra F, Olazarán S, Vera Y, Castillo R, Hernandez A (2002) Efficacy of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1*H*-benzimidazole against different stages of *Fasciola hepatica* in pelibuey sheep. *Vet Mex* 33:55-61
- Rivera N, Ibarra F, Zepeda A, Fortoul T, Hernandez A, Castillo R, Canto G (2004) Tegumental surface changes in adult *Fasciola hepatica* following treatment in vitro and in vivo with an experimental fasciolicide. *Parasitol Res* 93:283-286
- Stitt AW, Fairweather I (1994) The effect of the sulphoxide metabolite of triclabendazole (Fasinex) on the tegument of mature and immature stages of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 108:555-567
- Vera MY (1994) Comparación de la eficacia e impacto inmunológico de 2 fasciolicidas contra *F. hepatica* en borregos pelibuey infectados experimentalmente. MSc thesis, National Autonomous University of Mexico, Mexico City
- Verheyen A, Vampariys O, Van den Broeck C, Lauwers H, Thienpont D (1982) Progressive differences in drug-susceptibility of the adult liver fluke *Fasciola hepatica* L. *Parasitology* 84:11