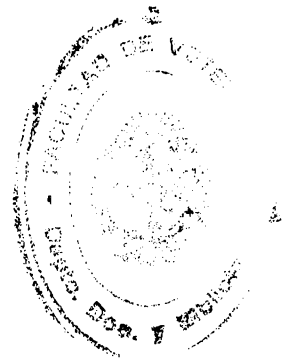


**UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**EVALUACIÓN DEL LUFENURON COMO DROGA ALTERNATIVA PARA EL
TRATAMIENTO DE LA HIDATIDOSIS**

Por

Fernanda ISNARDI



**TESIS presentada como uno de los requisitos para
obtener el título Doctor en Ciencias Veterinarias
(Orientación Higiene e Inspección de Alimentos)**

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2006**

049 TG
Evaluación del
Isnardi, Fernanda



TESIS DE GRADO aprobada por:


Presidente de Mesa:

Nombre completo y firma

Segundo Miembro (Tutor):

Nombre completo y firma

Tercer Miembro (Co-tutor):

Ana Maria Ferreira 

Nombre completo y firma

Fecha:

Autores:

Fernanda Isnardi

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos aquellos que colaboraron para que este trabajo pudiera realizarse, a mi tutor el Dr Breijo quién me guío con mucha paciencia, Ana Ferreira que contribuyó con su vista rigurosa y siempre acertada. Mariana Ferrari por su apoyo en las actividades del laboratorio.

A la Dra Mónica Brouer quién por su excelente trabajo en microscopía.

A los servicios veterinarios de los Frigoríficos San Jacinto, Schneck y Sarubí que me permitieron la búsqueda de material sin el cuál este trabajo no hubiera sido posible.

Al personal del campo experimental del Instituto de Higiene especialmente a Mary y Barrios.

Y a NovartisAnimal Health quién financió esta actividad.

Y a mi familia que siempre está acompañándome a crecer.

Tabla de contenido

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	IV
1. <u>RESUMEN</u>	1
2. <u>SUMMARY</u>	2
3. <u>INTRODUCCIÓN</u>	3
3.1. CICLO DE VIDA DE <i>E.granulosus</i>	3
3.2. ESTRUCTURA DEL METACESTDO	3
3.3. DISTRIBUCIÓN DE <i>E.granulosus</i> y ZONAS ENDÉMICAS	4
3.4. SINTOMATOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR LA LARVA Y TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD	4
4. <u>REVISIÓN BIBLIOGRAFICA</u>	7
4.1. LUFENURON COMO DROGA ALTERNATIVA AL TRATAMIENTO DE LA HIDATIDOSIS	7
5. <u>OBJETIVOS</u>	8
5.1. OBJETIVO GENERAL	8
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES	8
6. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	9
6.1. DROGAS Y REACTIVOS	9
6.2. RATONES.....	9
6.3. PARASITOS	9
6.4. EVALUACION DEL EFECTO TERAPÉUTICO DEL LUFENURON SOLO Y COMBINADO CON ALBENDAZOL	9
6.5. DETERMINACION DE IP6 EN LA PARED DE LOS QUISTES HIDATICOS	10
6.6. EVALUACION DEL EFECTO PROFILÁCTICO DEL LUFENURON SOLO Y COMBINADO CON ALBENDAZOL	10
6.7. ANALISIS ESTADÍSTICOS	11
7. <u>RESULTADOS</u>	12
7.1. EVALUACION DEL EFECTO TERAPÉUTICO DEL LUFENURON Y SU COMBINACION CON ALBENDAZOL	12
7.1.1 Análisis del número y tamaño de quistes obtenidos.....	12
7.1.2 Evaluación de la estructura de los quistes por microscopía óptica y electrónica de transmisión.....	12
7.1.3 Evaluación del contenido de IP6 en las paredes de los quistes.....	13
7.2. EVALUACION DEL EFECTO PROFILÁCTICO DEL LUFENURON SOLO Y COMBINADO CON ALBENDAZOL	13
7.2.1 Análisis del número y tamaño de los quistes obtenidos.....	13
7.2.2 Evaluación del contenido de IP6 en las paredes de los quistes.....	14
7.2.3 Estudio de la viabilidad parasitaria utilizando como modelo la incorporación de inositol ³ H.....	14
8. <u>DISCUSIÓN</u>	15
9. <u>CONCLUSIONES</u>	17
10. <u>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</u>	18

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

- CUADRO I** Evaluación del efecto del tratamiento terapéutico sobre el número y tamaño de Quistes Hidáticos (QH) colectados.
- CUADRO II** Análisis estadístico del efecto del tratamiento terapéutico sobre el número y tamaño de Quistes Hidáticos (QH) colectados
- CUADRO III** Evaluación del efecto del tratamiento profiláctico sobre el número y tamaño de Quistes Hidáticos (QH) colectados
- CUADRO IV** Análisis estadístico del efecto del tratamiento profiláctico sobre el número y tamaño de Quistes Hidáticos (QH) colectados.
- CUADRO V** Evaluación de los niveles de incorporación de inositol ³H en la pared de quistes sometidos al tratamiento profiláctico.
- FIGURA 1** Ciclo evolutivo y mecanismo de transmisión de E.granulosus.
- FIGURA 2** Vías de desarrollo de la infección hidática en hospederos intermediarios.
- FIGURA 3** Evaluación del efecto terapéutico del Lufenuron y su combinación con Albendazol sobre las paredes de los quistes, analizadas por microscopía óptica.
- FIGURA 4** Evaluación del efecto terapéutico del Lufenuron y u combinación con Albendazol sobre las paredes de los quistes, evaluadas por microscopía electrónica de transmisión.
- FIGURA 5** Análisis del contenido de IP6 en la pared de los quistes hidáticos murinos establecidos, tratados con Lufenuron (LUF), Albendazol (ABZ) y Lufenuron+Albendazol (LUF+ABZ).
- FIGURA 6** Análisis del contenido de IP6 en la pared de quistes hidáticos murinos sometidos a los tratamientos profilácticos con Lufenuron (LUF),Albendazol (ABZ) y Lufenuron+Albendazol (LUF+ABZ).

1. RESUMEN

La hidatidosis es una zoonosis producida por la forma larvaria del cestode *Echinococcus granulosus*. Este parásito, genera problemas en la salud pública y en la producción animal, y hay indicios que apuntan a una presencia creciente de esta enfermedad en algunas regiones del mundo.

Tradicionalmente, la hidatidosis en el hombre se ha considerado una patología de resolución quirúrgica. Sin embargo, desde la década del 80 se ha comenzado a aplicar quimioterapia. Algunas drogas como el Albendazol han demostrado tener cierto efecto contra la hidatidosis, sin embargo la larga duración de la terapia y su toxicidad hacen necesaria la búsqueda de otras alternativas terapéuticas. El Lufenuron pertenece al grupo de las drogas inhibidoras del crecimiento de insectos, las mismas impiden el correcto depósito de las fibras de quitina en la cutícula de los mismos. La cutícula de los insectos al igual que la pared externa de la forma larvaria del *Echinococcus granulosus* contienen un componente fibrilar de naturaleza glucosídica de forma tal que le confieren al parásito un soporte mecánico y estructural. En este trabajo se planteó la hipótesis de que el Lufenuron podría ser de utilidad en el tratamiento de la infección hidática en base a las similitudes estructurales del exoesqueleto de los insectos y de la pared del quiste hidático. Para ello, utilizando el modelo de infección hidática secundaria, se estudió el efecto del tratamiento de Lufenuron y su combinación con Albendazol, sobre quistes hidáticos murinos totalmente desarrollados (efecto terapéutico), y sobre la capacidad de protoescolices de alcanzar el estadio quístico (efecto profiláctico).

En este estudio se observó que en ninguno de dos experimentos (efecto profiláctico y terapéutico) se logró reducir significativamente el número de quistes cosechados por animal; donde si pudieron hallarse diferencias fue en el tamaño de los quistes colectados. Con el tratamiento realizado sobre quistes establecidos el diámetro medio de los quistes del grupo control fue de 5.4mm, en el grupo Albendazol fue de 4.8mm, en el grupo Lufenuron fue de 5.1mm y en el grupo Lufenuron-Albendazol fue de 3.9mm, con estos resultados podemos apreciar que existe un efecto de las drogas en el crecimiento de los quistes con un mayor efecto sobre el grupo que fuera tratado con ambas drogas. Con el tratamiento profiláctico los resultados sobre el tamaño fueron de 3.1mm en el grupo Control, 2.2 en el grupo Albendazol, 3.2 en el grupo Lufenuron y 2.2 en el grupo Lufenuron-Albendazol; aquí también se hallan diferencias significativas en el tamaño de los quistes que fueron tratados con Albendazol y con Lufenuron-Albendazol en este caso no pudo apreciarse un efecto sinérgico de las drogas.

Asociaciones entre la reducción del crecimiento con las alteraciones observadas en la pared de los quistes tratados son discutidas.

2. SUMMARY

Hydatid disease is a zoonosis caused by the larval stage of *Echinococcus granulosus*. Annually this parasite provokes huge economic losses due to decreased production, and it constitutes a major human public health problem. Epidemiological studies are showing that the distribution of this pathology is increasing in some regions of the world. In humans the treatment of this disease is basically the surgery. Total surgical removal of hydatid cyst is still the gold standard treatment for HD, but in the last years the use of chemotherapy has been increasing. Some drugs like Albendazol has shown partial efficacy against hydatid disease, however due it toxicity and the large treatments recommended, it is necessary to search for other therapeutic alternatives.

Lufenuron is an insect growth inhibitor drug, which affect the cuticle synthesis of the insects by altering the normal deposition of chitin fibres. The insect cuticle as well as the cyst wall of the metacestode of *E. granulosus* are composed by glucidic fibres which confers mechanical and structural support.

Based on the functional and structural similarities between insect cuticle and hydatid cyst wall, we studied if Lufenuron can be used as alternative drug in the hydatid disease.

Using the murine secondary infection model of hydatid disease, we study the effect of Lufenuron alone or combined with Albendazole on fully developed cyst (therapeutic treatment) and on the capacity of protoscolices to reach the cystic stage (prophylactic treatment).

In both experiments performed we observed that was not differences between the numbers of cysts recovered from treated mice in comparison with the control. However, when the therapeutic treatment was performed we observed a significant reduction in the size of the recovery cysts. The size of the cyst in the control group was 5.4mm, the Albendazole group was 4.8mm, Lufenuron group 5.1 mm and the Lufenuron-Albendazole group was 3.9mm. These results shows that the combination Lufenuron-Albendazol provoked a higher reduction on the cyst size than the treatments performed with each drug separately.

When the prophylactic treatment was performed, the recovered cysts in the control group was 3.1 mm, 2.2mm in the Albendazole group; 3.2mm in Lufenuron group and 2.2 in the Lufenuron Albendazol group. These results showed that there was significant reduction of the cyst size in the treatments with Albendazole and Lufenuron Albendazol in comparison with the control. However, in this opportunity we could not appreciate an synergic effect between drugs.

In the therapeutic treatment, relationships between the cyst size reduction and microscopic and biochemical alterations on the hydatid cyst walls are discussed.

3. INTRODUCCIÓN

La hidatidosis es una zoonosis causada por la forma larvaria (metacestode) de *Echinococcus granulosus*, se trata de un cestode perteneciente al género *Echinococcus* (familia *Taeniidae*). Dentro de este género también se incluyen otras 3 especies *E.multilocularis*, *E.vogeli* y *E.oligarthrus*. Las dos especies de mayor importancia para la salud pública son *E.granulosus* y *E. Multilocularis* (Atias, 1999; Acha, 2002).

3.1 CICLO DE VIDA DE *E.granulosus*

Como otros miembros de la familia *Taeniidae*, *Echinococcus* requiere dos hospedadores mamíferos para completar su ciclo de vida (Thompson R.C.A, 1995). La forma adulta (tenia), es pequeña mide de 2.5 a 9 mm de largo y por lo regular no tiene más de cuatro proglótidos siendo el último grávido y mucho más grande. Se aloja en el intestino delgado de perros y otros cánidos, a los que llamamos hospederos definitivos (HD) (Lapage.G, 1971). En los perros parasitados en general no provocan síntomas a menos que la carga parasitaria sea muy elevada. A partir de los proglótidos grávidos se eliminan al exterior huevos, estos son de forma ligeramente ovoide y a semejanza de todas las especies del género *Taenia*, poseen una envoltura estriada radialmente, miden de 32 a 36 micras de largo por 25 a 30 micras de ancho, poseen en su interior un solo embrión (oncosfera) (Lapage. G, 1971). Estos huevos salen con las excretas del perro y contaminan su pelaje, el suelo, pastos verduras y agua de bebida. De allí son tomados por los hospederos intermediarios: bovinos, ovinos, porcinos y accidentalmente, por el hombre (Atias 1999). La oncosfera es liberada y penetra la lámina propia del intestino y es transportada en forma pasiva a través de la corriente sanguínea o los vasos linfáticos hasta el hígado pulmones u otros órganos donde dará lugar al metacestode. Se trata de un quiste compuesto de dos capas una más interna llamada capa germinativa y otra capa de naturaleza acelular denominada capa laminar, y a su vez estas están rodeadas por una cápsula fibrosa que es originada por una reacción tisular del hospedero, a este conjunto se le denomina Quiste Hidático (QH). La capa germinativa por multiplicación asexual da lugar a miles de protoescólices (PSC) que son la forma infectante para el HD. Los PSC tienen la capacidad de transformarse en tenia adulta una vez que son ingeridos por el HD, pero también pueden dar origen a nuevos quistes a partir de la ruptura de quistes primarios, fenómeno conocido como hidatidosis secundaria (Thompson R.C.A, 1995). Luego de la ingestión por un HD los PSC se evaginan y se adhieren a la mucosa intestinal, dónde se desarrollan hasta el estado adulto, la madurez sexual se alcanza en un lapso de 4 a 5 semanas. Los huevos liberados con las heces pueden permanecer durante largos períodos de tiempo en el medio ambiente (ver figura 1).

3.2 ESTRUCTURA DEL METACESTODO.

Es típicamente un quiste unilocular, de forma subesférica y de contenido líquido, que se encuentra a presión en su interior. Este líquido, llamado líquido hidático genera presión intraquistica que tensa la pared del quiste (PQH).

La capa mas interna denominada capa germinal es una estructura delgada (de 15 a 20µm de espesor) y de aspecto finamente granular. Desde el punto de vista histológico

es una masa de aspecto sincicial con numerosos núcleos y muy rica en glucógeno (Atias, 1999). Este sincitio es el responsable de la síntesis de la capa más externa (capa laminar) y de la generación hacia el interior del QH de vesículas prolíferas, que en su interior por gemación dan lugar a los PSC.

La capa más externa o laminar; es una estructura acelular, rica en carbohidratos y sus funciones principales son aportar un soporte mecánico al quiste y además formar una barrera física que protege la capa germinativa de la repuesta inmune celular. Esta capa presenta una estructura estratificada, formada por un componente de tipo mucina que se dispone en forma de fibras rica en N-acetilglucosamina y un componente granular formado principalmente por el myo-inositol hexakisphosphate (IP6) (Irigoin *et al* 2002; Steers *et al* 2001). No contiene glucógeno y no presenta ninguna actividad respiratoria. Las láminas o "estratos" de ésta capa se exfolian constantemente hacia la periferia y son renovados desde la cara profunda de la capa por la actividad regenerativa de la capa germinativa (ver figura 2).

3.3 DISTRIBUCIÓN DE *E.granulosus* Y ZONAS ENDÉMICAS

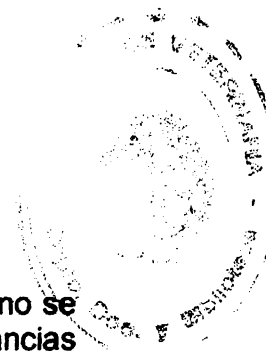
Este parásito, genera problemas en la salud pública y en la producción animal, y hay indicios que apuntan a una presencia creciente de esta enfermedad en algunas regiones del mundo. Son áreas de alta endemicidad; la parte meridional de América del Sur, (Argentina, sur de Brasil, Chile, Perú, y Uruguay); el litoral del Mediterráneo, (Bulgaria, Chipre, España, sur de Francia, Grecia, Italia, Portugal, Rumania y Yugoslavia); el sudoeste de Asia (Irak, Irán y Turquía); el norte de África (Argelia, Marruecos y Túnez) y Oceanía (Australia, Nueva Zelanda). Sólo en zonas muy delimitadas, en particular algunas islas, se ha logrado reducir a niveles muy bajos o interrumpir completamente la transmisión de la enfermedad con la aplicación de medidas de control. En áreas continentales, sin embargo, la lucha contra *E. granulosus* resulta no sólo más difícil y a menudo menos eficaz sino también más cara, y exige varias décadas de esfuerzo incesante (Acha. P, 2003).

Las causas que favorecen la difusión de esta parasitosis en la naturaleza, son el desconocimiento del problema por la población, los hábitos y actitudes perniciosas (alimentación de perros con vísceras crudas parasitadas, matanza clandestina de animales y abundancia de perros) que facilitan la infección de los animales y del mismo hombre (Atias. 1999).

El control de la enfermedad esta basado en programas de educación y en el tratamiento sistemático del hospedador definitivo, sobre todo de los perros en áreas rurales con drogas antihelminéticas (praziquantel). De esta forma, se busca cortar el ciclo perro-ovino reduciendo las áreas contaminadas con huevos (Cabrera *et al* 2002).

3.4 SINTOMATOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR LA LARVA Y TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD

La infección en el HI produce una sintomatología clínica asociada a una disminución progresiva del parénquima del órgano infectado producto de la reacción inflamatoria mantenida por el hospedero y de la presión ejercida por el quiste a medida que se expande (Larrieu *et al* 2000). Teniendo en cuenta la gran variedad de posibles localizaciones, siendo las principales a nivel hepático y pulmonar, el cuadro clínico es



variable y el período de incubación en general es de varios años.

En animales de interés productivo (ovinos, bovinos, etc) la hidatidosis en general no se manifiesta clínicamente. Las pérdidas económicas derivan de la caída en las ganancias de peso y del decomiso de las vísceras parasitadas en playas de faena (Torgerson *et al*, 2000).

El hombre es un huésped intermediario accidental que padece las consecuencias clínicas de la infección, pero que no interviene epidemiológicamente en el mantenimiento de la infección.

La hidatidosis humana afecta individuos de todas las edades aunque es más frecuente en niños que en adultos, esto se debe al contacto más estrecho que existe entre estos y los perros (Anadol *et al* 2001). El diagnóstico se establece en base a los hallazgos clínicos, por técnicas serológicas y técnicas de imagenología (Aydin *et al* 2003). Tradicionalmente, la hidatidosis en el hombre se ha considerado una patología de resolución quirúrgica, existen condiciones determinadas por el paciente (edad, embarazo, etc) y determinadas por las características de la infección (número de quistes, tamaño, localización, etc) que hacen inviable esta alternativa terapéutica, por esta razón en los últimos años han comenzado a aplicarse la quimioterapia con benzimidazoles (Mebendazol y Albendazol) y los tratamientos quirúrgicos poco invasores como la punción-aspiración-inyección re-aspiratoria (PAIR) (Larrieu *et al*, 2000). Los benzimidazoles carbamatos han demostrado tener cierta actividad larvicida contra el *E.granulosus*. El mecanismo de acción de estas drogas incluye la inhibición de la tubulina, un bloqueo en la absorción de glucosa, una depleción del glucógeno y alteraciones degenerativas a nivel del retículo endoplásmico y de las mitocondrias de la capa germinativa, hay un incremento en la actividad de los lisosomas y autólisis celular (Anadol. *et al*, 2001 Menezes. 2003). El Mebendazol fue el primer benzimidazol carbamato usado en el tratamiento de la hidatidosis humana. Su mayor dificultad es su pobre absorción a nivel intestinal, impidiendo que la droga alcance altas concentraciones plasmáticas y en la cavidad del quiste. No se han establecido regímenes estándar para el tratamiento, pero generalmente se recomienda el uso de 40-60 mg/kg por día durante varios meses generalmente por un tiempo superior a un año (Anadol *et al*, 2001). El Albendazol es el más reciente benzimidazol carbamato desarrollado, que ha probado ser efectivo para el tratamiento de la hidatidosis. Al igual que el Mebendazol es pobremente absorbido luego de la administración oral. En el organismo el Albendazol es metabolizado en 3 derivados luego de su ingestión: sulfóxido, sulfona y 2-aminosulfonas. El derivado sulfóxido es el que tiene efecto antihelmíntico, además difunde libremente a través de la cápsula y se concentra en la capa germinal y en el fluido del quiste. Con algunas excepciones, el Mebendazol y Albendazol es generalmente bien tolerado, dentro de los posibles efectos secundarios se cuentan la inhibición parcial de las enzimas microsomales a nivel hepático, por esta razón es recomendable que sea administrado en ciclos (Anadol *et al* 2001, El-On.J, 2004). En la hidatidosis, la evaluación de la eficacia de distintas drogas en general y de los benzimidazoles en particular es dificultosa, debido a diferentes factores relacionados al hospedador y a las características del parásito, como ser el lento crecimiento del parásito, la inhabilidad para demostrar la viabilidad del parásito antes y después del tratamiento, la no disponibilidad de marcadores serológicos de viabilidad y la presencia de ambos tipos de quistes vivos y muertos en el mismo paciente. Por esta razón, es fundamental desarrollar modelos que permitan evaluar la eficacia real de estas drogas

sobre el quiste.

4. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

4.1 LUFENURON COMO DROGA ALTERNATIVA AL TRATAMIENTO DE LA HIDATIDOSIS

En la década de los setenta surgió un nuevo grupo de drogas destinadas al control de ectoparásitos, cuyo blanco de acción son moléculas responsables del crecimiento y la muda de los parásitos. Se les llamó genéricamente drogas reguladoras del crecimiento de los insectos del inglés (*Inhibitor Growth Regulators, IGRs*).

Son ejemplos de IGRs, los análogos de hormonas juveniles que bloquean los receptores de las hormonas en las larvas evitando su muda y drogas que afectan la síntesis del exoesqueleto (*Chitin Síntesis Inhibitors*) inhibiendo la síntesis y depósito de la quitina en la cutícula de insectos y otros artrópodos. Dentro de este último grupo, las benzofenilureas (BPU), han sido muy utilizadas para el control de ectoparásitos en veterinaria. El modo exacto de acción de las BPU no está comprendido aún, pero se ha visto que interfieren en el ensamblaje de las cadenas de quitina (Graf, 1999, Schenker, 1999). La quitina es un polisacárido muy difundido como material estructural entre los invertebrados, en especial formando parte de los exoesqueletos. Químicamente es un polímero de N-acetil glucosamina; estas monosas se polimerizan y luego se ensamblan junto a proteínas en cadenas y éstas en microfibras. Se ha visto que si se altera la síntesis y el depósito de quitina en los exoesqueletos, se genera una fragilidad estructural en el insecto, que lo lleva a la pérdida de fluidos y a su muerte (Schenker, 1999).

El Lufenuron es una BPU que en medicina veterinaria se utiliza principalmente para el control y tratamiento en infestaciones por pulgas. La quitina constituye en las pulgas un 25 a 50% del peso seco de las mismas.

Alternativamente, el Lufenuron también ha sido utilizado para el control de dermatitis micóticas en perros y gatos originadas por las especies de *Microsporum spp*, *Trichofiton spp* y *Epidermophiton spp* (Ben Zyoni *et al*, 2000) y endometritis micóticas en yeguas (Hess *et al*, 2002). Las paredes de las células de los hongos también están rodeadas de un complejo polisacárido compuesto primariamente por quitina, quitosan, glucanos y mananos.

Tal como se describió anteriormente la capa externa de la PQH es una estructura acelular llamada capa laminar, rica en carbohidratos y cuya función incluye aportar un soporte mecánico al quiste y formar una barrera que protege la parte viva del quiste (capa germinativa) de la repuesta inmune celular. Las similitudes funcionales y estructurales halladas entre el exoesqueleto de las pulgas y otros parásitos y la capa laminar del QH, nos permite arribar a la hipótesis que el Lufenuron por su efecto tóxico se asociaría con la interferencia en la síntesis o el armado de las fibras de la capa laminar por esta razón tiene valor potencial como droga para el tratamiento de la infección hidática.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo es evaluar el efecto del Lufenuron como droga alternativa para el tratamiento de la hidatidosis.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

5.2.1 Evaluar el efecto terapéutico del Lufenuron sólo y en forma combinada con Albendazol en la hidatidosis.

En este objetivo se estudiará el efecto del tratamiento sobre quistes ya formados.

5.2.2 Evaluar el efecto profiláctico en la hidatidosis del tratamiento con Lufenuron sólo y combinado con Albendazol.

En este caso se pretende determinar si el efecto del Lufenurón solo y/o combinado con Albendazol impiden el desarrollo de los PSC hacia quistes. Este objetivo estudia el efecto del tratamiento en caso de una resiembra de PSC frente a la ruptura espontánea de un quiste o secundaria a un acto quirúrgico. En el contexto de este experimento se intentó diseñar un método alternativo que permita determinar la viabilidad de los quistes. A diferencia de la evaluación de viabilidad en los PSC, la cual se puede determinar por exclusión de colorantes vitales o el movimiento de células flamíferas, (Gurrí, 1963), la evaluación de la viabilidad del metacestode totalmente desarrollado es muy difícil. Dado que el inositol es utilizado por el QH para la síntesis de IP6 y su posterior depósito en la capa laminar, se intentará utilizar el índice de incorporación de inositol como un marcador de viabilidad.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 DROGAS Y REACTIVOS

Lufenuron, en forma de principio activo y con un 99% de pureza fue provisto por Novartis Animal Health, Suiza. Albendazol, en forma de principio activo y con un 96% de pureza y gliceroformal fue donado por el laboratorio Microsules, Uruguay. Polietilenglicol 400 (PEG 400) (Droguería Industrial Uruguay), Medio de cultivo EBSS (Sigma), Fitasa (Sigma), ácido fítico (myo-inositol hexakisfosfato IP6 (Sigma). Placas de Polietilenamina (PEI)-celulosa de Macherey-Nagel (Düren, Alemania)

6.2 RATONES

Ratones CD1 de 6 a 8 semanas de edad fueron provistos por el Bioterio del Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Ratones Balb/c de 6 a 8 semanas fueron provistos por el Bioterio del laboratorio Rubino, Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Todos los animales se mantuvieron con alimento y agua *Ad libitum*, en el Área de Inmunología de la Facultad de Veterinaria.

6.3 PARÁSITOS

Los QH se obtuvieron a partir de las vísceras de bovinos y ovinos faenados en frigoríficos locales. Una vez en el laboratorio éstos se puncionaron en forma aséptica y se extrajeron los PSC viables según lo descrito por Breijo *et al*, (1998). Se utilizó en la infección aquellas partidas de PSC que superaron el 90 % de viabilidad.

6.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO TERAPÉUTICO DEL LUFENURON SOLO Y COMBINADO CON ALBENDAZOL.

Se infectaron 80 ratones (cepa CD1) por vía intraperitoneal con una suspensión conteniendo 2000 PSC viables de *E. granulosus* (Breijo *et al*, 1998). A los cuatro meses post-infección los ratones se dividieron en 4 grupos (n=20) y se trataron según el siguiente esquema:

- Grupo Albendazol (ABZ): se administró por vía oral 50 µl de una suspensión de Albendazol en PEG 400 a una dosis de 50 mg/kg en Polietilenglicol 400, la dosis utilizada es la que se utiliza en humanos en tratamientos convencionales (Anadol *et al* 2001). Se dosificó 5 veces por semana por el término de 8 semanas.
- Grupo Lufenuron (LUF): se dosificó a una dosis de 100 mg/kg por vía subcutánea utilizando gliceroformal como excipiente, a este régimen de dosificación se arribó realizando trabajos previos de farmacocinética en ratón a partir de datos originales de la droga utilizados en gato (Schenker. R, 1999). La dosificación se realizó cada 15 días por un lapso de 8 semanas.
- Grupo Lufenuron-Albendazol (LUF+ABZ): este grupo se trató con ambas drogas y cada una de ellas se administró siguiendo el mismo protocolo que en los grupos ABZ y LUF respectivamente.
- Grupo Control: este grupo se trató con los excipientes usados gliceroformal y polietilenglicol 400 siguiendo el mismo protocolo que fue usado con las drogas.

A los 240 días de infección se sacrificaron los animales por dislocación cervical y se

colectaron los quistes.

Para determinar el efecto de los distintos tratamientos se analizó:

i) El número y el tamaño de los quistes obtenidos.

ii) La estructura de la pared de la PQH, evaluada mediante microscopía óptica y electrónica.

iii) El contenido de IP6 en la PQH.

La microscopía óptica y electrónica fue realizada por la Dra Mónica Brauer en el Departamento de Biología Celular Instituto Clemente Estable.

6.5 DETERMINACIÓN DE IP6 EN LA PARED DE LOS QUISTES HIDÁTICOS

La determinación de IP6 en la PQH se realizó de acuerdo a lo descrito por Irigoín *et al* 2002.

Se tomaron 40 mg de PQH pertenecientes a cada grupo. Estas en primer lugar fueron extensamente lavadas con PBS 0.5 mM CaCl₂ (PBS-Ca) y luego con PBS-Ca conteniendo Tween20 (0.05%). El IP6 fue totalmente removido de las PQH mediante incubación con una solución de EDTA 25mM durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA). El tratamiento con el quelante permite extraer el IP6 de las paredes, el cuál queda libre en el sobrenadante. Luego, los sobrenadantes fueron dializados contra agua MilliQ durante 24 horas a TA para asegurar la remoción total de las sales y posteriormente se concentraron (80 veces) utilizando el equipo speedvac (Savant Instruments, Farmingdale, NY, EUA). Las muestras secas se resuspenden en ácido clorhídrico 0.3N y se analizaron por cromatografía en capa fina (TLC), sobre placas de polietilenamina (PEI)-celulosa. Se sembraron 5µl de muestra, en las placas de (PEI)-celulosa, se dejó secar y se realizó la cromatografía utilizando como fase móvil HCL1N. Se secó la placa utilizando una plancha eléctrica y se reveló humedeciendo la placa con el revelador para grupos fosfatos : 3 partes en volumen de H₂O/HClO₄/HCL(100:10:1) y una de molibdato de amonio /HClO₄/9%,p/v en H₂O). Se secó nuevamente en plancha eléctrica y se expuso la placa a la luz ultravioleta durante 2 minutos, utilizando un transiluminador (Bioblock Scientific, Paris, Francia).

6.6 EVALUACIÓN DEL EFECTO PROFILÁCTICO DEL LUFENURON SÓLO Y COMBINADO CON ALBENDAZOL.

Para ello se infectaron 60 ratones (BALB/c), de 8 semanas de edad siguiendo el protocolo descrito por Breijo *et al* 1998. Los animales se dividieron en cuatro grupos de quince ratones cada uno y el tratamiento con las drogas se inició a las 24 horas post infección y se extendió durante ocho meses según el siguiente esquema:

- Grupo Albendazol (ABZ): se administró vía oral 50 µl de una suspensión de albendazol en PEG 400 a una dosis de 50mg/kg. Se dosificó durante ocho meses, por periodos de cuatro semanas (con una frecuencia de cinco veces por semana) con intervalos de descanso de 4 semanas.
- Grupo Lufenuron (LUF): se administraron por vía subcutánea 100µl de una solución de Lufenuron en gliceroformal, a una dosis de 100 mg/kg. La dosificación se realizó cada 15 días comenzando de manera inmediata a la infección, el tratamiento se extendió por seis meses.

- Grupo Lufenuron Albendazol (LUF+ABZ): se trató de manera simultánea con las dos drogas Lufenuron (100mg/kg, vía subcutánea) y Albendazol (50mg/kg, vía oral) siguiendo el protocolo de dosificación que se utilizó en el grupo ABZ y en el LUF respectivamente.
- Grupo control: se le administró los excipientes gliceroformal (vía subcutánea) y polietilenglicol (vía oral) siguiendo el mismo esquema de dosificación que se utilizó para las drogas.

Al día 240 post-infección los ratones infectados se sacrificaron por dislocación cervical y los quistes hidáticos se extrajeron en forma aséptica.

Para determinar el efecto de los distintos tratamientos se evaluó:

i) El número y el tamaño de los quistes obtenidos.

ii) El contenido de IP6 en la pared de los quistes siguiendo el mismo método descrito en 6.4 y la viabilidad parasitaria mediante la determinación del nivel de incorporación de inositol ^3H . Este estudio se realizó sobre 10 QH de entre 2 y 8mm de diámetro removidos de ratones de cada uno de los lotes. Además a partir del lote Control se preparó un grupo de 5 QH muertos. Para ello los QH fueron tratados con NaCl 2M durante 2hs a temperatura ambiente (TA). Luego todos los grupos de QH se lavan y equilibran en medio de cultivo EBSS y se incubaron durante 48hs a 37°C, 5% CO₂ en medio de cultivo EBSS conteniendo penicilina/estreptomicina y se adiciona 10μCi/mL de ^3H inositol. Terminada la incubación, todos los quistes fueron muertos con una solución 2M de NaCl durante 2hs a TA. Cada lote de QH se puncionó y se centrifugó para separar el líquido hidático de las paredes. Por último cada lote se lo dividió en dos, a uno de ellos se lo incubó con una solución de fitasa (a una relación de 0.75 unidades/quiste de entre 0.2 a 0.4mm de diámetro en buffer acetato de sodio 200mM PH 5 conteniendo 500 mM de CaCl₂) durante toda la noche a 37°C, a los efectos de extraer el inositol que fuera incorporado en la pared de los quistes. El otro subgrupo actúa como control del tratamiento con fitasa, para esto se lo incubó con buffer acetato de Ca²⁺ durante toda la noche a 37°C. Luego se recogieron los sobrenadantes y se midió actividad radioactiva (^3H) utilizando un contador de misión betta (cuentas por minuto CCPM).

6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

La comparación del efecto de los tratamientos entre los diferentes grupos se realizó utilizando test estadísticos no paramétricos (Wilcoxon; Kruskal Wallis test). Es importante considerar que según este diseño experimental, para que exista una probabilidad menor al 5% de que los tratamientos por azar sean iguales, el valor de p debe ser menor a 0,0087 para el test de Bonferroni. Se contó con el apoyo del Dr. Piaggio del Departamento de Bioestadística; Facultad de Veterinaria UDELAR.

7. RESULTADOS

7.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO TERAPÉUTICO DEL LUFENURON Y SU COMBINACIÓN CON ALBENDAZOL

Para evaluar el efecto terapéutico del Lufenuron y su combinación con Albendazol sobre la infección sobre QH ya establecidos se infectaron ratones con PSC de *E. granulosus* por vía intraperitoneal y se esperó a que el parásito se estableciera y creciera en un lapso de cuatro meses. Pasado este tiempo se comenzaron a administrar las drogas, por lo cual en este experimento evaluamos el efecto de éstas sobre el QH ya establecido, siguiendo el esquema de dosificación que ya fuera mencionado.

7.1.1 Análisis del número y tamaño de quistes obtenidos

A los 240 días post-infección se sacrificaron los animales y se procedió al conteo del número de quistes presentes en cada animal y a la determinación del tamaño de los mismos. Tal como se muestra el cuadro I, el número de quistes encontrados en cada uno de los grupos tratados es comparable con al correspondiente al control. Sin embargo cuando analizamos el tamaño de los quistes cosechados se desprende que existen diferencias en el crecimiento de estos según los tratamientos efectuados. Como se puede observar el cuadro II, los quistes de mayor tamaño estuvieron presentes en los grupos Control y ABZ superando algunos de ellos los 20 mm de diámetro. Por otro lado el mayor número de quistes menores a 3 mm pertenecieron al grupo LUF+ABZ. Estos resultados se vieron reflejados en las medias de los diámetros de los quistes registrados en cada grupo. Mientras que en los grupos Control, ABZ y LUF los diámetros promedio fueron de 5.3mm; 4.7mm y 5.1mm respectivamente el diámetro promedio del grupo LUF+ABZ fue de 3,9 mm (cuadro IIA). El análisis estadístico realizado muestra que existen diferencias significativas en el tamaño de los quistes en el grupo LUF+ABZ, (Wilcoxon test). En la cuadro IIB, puede apreciarse que el grupo LUF+ABZ mostró diferencias con respecto a los grupos Control, ABZ y LUF ($p < 0,0000$, $0,0004$ y $0,0000$ respectivamente). Este resultado demuestra que el Lufenuron sólo no es capaz de provocar un efecto en el crecimiento de los quistes pero su combinación con albendazol si muestra este efecto.

7.1.2 Evaluación de la estructura de los quistes por microscopía óptica y electrónica de transmisión

En primera instancia se analizó por microscopía óptica el aspecto morfológico de la paredes de los quistes del grupo control y de los grupos tratados.

Como se muestra en la figura 3, la capa laminar y la capa germinal de los quistes colectados a partir del grupo LUF, ABZ, y LUF+ABZ muestran algunas alteraciones estructurales, dadas por engrosamiento y aspecto mas vacuolar de la capa germinativa y una distribución menos uniforme de la capa laminar. Estas alteraciones parecen ser más severas en los quistes estudiados del grupo tratado con Lufenuron.

Al microscopio electrónico de transmisión (MET), al igual que a la microscopía óptica,

se observaron similares modificaciones estructurales. En la figura 4ABC se aprecia el aspecto de los quistes hidáticos normales obtenidos de ratones del grupo Control, en estos se aprecia la capa laminar con tramado fibrilar de aspecto homogéneo y microtriquias de una distribución y tamaño adecuados. En las figuras 4DEF, 4GHI, 4JKL se aprecian quistes hidáticos obtenidos a partir de los grupos tratados con Albendazol, Lufenuron y Lufenuron Albendazol respectivamente. En estos puede apreciarse que existe una alteración de las microtriquias, estas se aprecian en menor número por unidad de superficie y su tamaño se halla disminuido. Por otra parte puede observarse que una distribución menos homogénea de las fibras de la capa laminar, estas alteraciones son más notorias en aquellos quistes que fueron tratados con Lufenuron Albendazol.

7.1.3 Evaluación del contenido de IP6 en las paredes de los quistes

Dado que el IP6 unido al calcio representa el 15% de la materia seca total de la pared de un quiste, estudiamos, si el contenido de este compuesto en la pared de los quistes tratados sufrió algún cambio, mediante cromatografía en capa fina (TLC).

Tal como se muestra en la figura 5 puede apreciarse que en los extractos de pared obtenidos de los grupos de QH tratados y del Control, existen diferencias en el contenido de IP6 de las paredes.

Se aprecia una reducción del contenido de IP6 por cada gramo de pared de quiste en peso húmedo en los grupos LUF y LUF+ABZ (figura 5 carriles 8,9,10,11,12 y 13 respectivamente). Cuando comparamos a estos dos últimos entre sí, es visible una menor concentración de IP6 en el grupo tratado con la combinación de las drogas (figura 5 carriles 11, 12 y 13).

7.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO PROFILÁCTICO DEL LUFENURON SOLO Y COMBINADO CON ALBENDAZOL

Para evaluar el efecto profiláctico del Lufenuron y su combinación con Albendazol se infectaron ratones con PSC de *E.granulosus* vía intraperitoneal y se inició el tratamiento de manera inmediata, de esta forma se pretende determinar si las drogas tienen efecto sobre los PSC, e impiden el desarrollo de estos hasta quistes.

7.2.1 Análisis del número y tamaño de quistes obtenidos

El número de QH establecidos, en cada grupo fue similar no existiendo diferencias significativas entre los mismos. Sin embargo, vale la pena notar que el número total de QH en todos los grupos tratados fue menor que en el grupo Control, al igual que el número promedio de los QH recuperados por animal, de todo modos estas tendencias no fueron estadísticamente significativas (cuadro IV A).

Cuando se evaluó el efecto de los tratamientos sobre el tamaño de los quistes, se observó que grupos ABZ y LUF+ABZ tuvieron un desarrollo quístico menor con respecto al grupo Control. El tamaño promedio de los quistes fue de 2.19 mm y de 2.23 mm para los grupos ABZ y LUF+ABZ respectivamente y 3.13 mm y 3.2 mm en los grupos Control y LUF (cuadro IVA).

De la comparación en los tamaños de los quistes de los grupos ABZ y ABZ+LUF, no se pueden inferir que la combinación de las drogas tuvo un efecto mayor ($p= 0.8223$) ver

cuadro IVB.

7.2.2 Evaluación del contenido de IP6 en las paredes de los quistes

Las señales obtenidas en cada uno de los extractos de pared de los distintos grupos estudiados no permiten determinar si existen diferencias en la concentración de IP6 en la pared de los quistes obtenidos (figura 6).

7.2.3 Estudio de viabilidad parasitaria utilizando como modelo la incorporación de inositol ³H.

Vistos los resultados obtenidos podemos afirmar que este nuevo diseño experimental permite utilizar al inositol marcado radiactivamente como un marcador de metabolismo parasitario, ya que se observaron diferencias en la incorporación de inositol ³H entre los parásitos vivos y muertos. En segunda instancia, los niveles de incorporación de inositol ³H en los QH tratados fueron similares y no nos permitió visualizar diferencias de viabilidad entre los QH recuperados de animales que fueron tratados respecto al Control (Ver cuadro V).

8. DISCUSIÓN

En la hidatidosis humana, la cirugía sigue siendo el tratamiento de elección. Si bien desde la década del 60 se han desarrollado drogas que han sido utilizadas para el tratamiento, estas no han mostrado ser del todo eficaces para la resolución de la enfermedad. Es por ésta razón que resulta necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas.

En el presente trabajo se estudió si el Lufenuron es una droga alternativa o complementaria para el tratamiento de la hidatidosis. Para ello, se investigó sobre las propiedades de la droga sola o combinada con Albendazol (que es la droga de elección en esta patología).

El efecto de la acción de estas drogas se analizó frente a protoescolices y a quistes totalmente desarrollados, ya que ambos estados parasitarios son morfológicamente diferentes y han mostrado diferencias en la susceptibilidad al tratamiento con antihelmínticos de uso corriente (Urrea-París *et al* 1999).

Cuando se ensayó el efecto terapéutico del Lufenuron sólo y combinado con Albendazol frente a los quistes totalmente desarrollados; en el tiempo en que se desarrolló la experiencia, no se hallaron diferencias en el número de quistes desarrollados en los diferentes grupos. Este resultado no es del todo sorprendente en el modelo en que se realizó el tratamiento (quistes establecidos), ya que los parásitos aún muertos no son fácilmente removidos incluso después de su muerte. La dificultad de remoción de los parásitos se ve incluso con los protoescolices ya que en infecciones experimentales pueden observarse protoescolices muertos luego de muchos meses de infección.

En cuanto al tamaño de los quistes colectados, si fue posible hallar diferencias estadísticamente significativas, en este caso aquellos quistes que fueron tratados con la combinación de Lufenuron-Albendazol tuvieron un crecimiento significativamente menor que los quistes del grupo Control y que el grupo Lufenuron y Albendazol respectivamente. Estos resultados permiten concluir que existió un efecto sinérgico entre ambas drogas observando que la combinación provocó una reducción mayor en el tamaño de los quistes cosechados.

En la microscopía óptica como en la microscopía electrónica se observaron diferencias estructurales en la pared de los quistes tratados respecto al control. En la microscopía óptica, se puede visualizar una alteración en la disposición macroscópica de las fibras de la capa laminar, se aprecian más separadas (figura 3), similar a las alteraciones que fueron descritas por Schenker, R *et al*; 1999 en la cutícula de las pulgas adultas que fueron tratadas con Lufenuron.

En la microscopía electrónica, se visualizan cambios en la disposición y densidad de las fibras de la capa laminar, principalmente en aquellos quistes que fueron tratados con la combinación Lufenuron-Albendazol.

Estos resultados se pueden correlacionar con los hallados en la cuantificación de IP6 por cromatografía en capa fina de la pared de los quistes, en los cuales se aprecia una disminución del contenido de ésta molécula en las paredes de los quistes que fueron tratados con Lufenuron-Albendazol. Como fuera mencionado por Irigoien, F *et al* 2002 el IP6 es un importante constituyente de la capa laminar y hasta ahora se ha visto que interacciona con el Ca^{++} . Si bien su función no está clara, se cree que participa como

elemento estructural de la capa laminar.

Los distintos resultados obtenidos, indican que la combinación de las drogas ensayadas redujo la capacidad de crecimiento de los parásitos probablemente debido a la interferencia en el normal ensamblado de las fibras de la pared del quiste hidático y el depósito de IP6. En quistes mas desarrollados dicha interferencia podría contribuir a la disminución de la resistencia mecánica de la pared del quiste hidático, reduciendo el control de esta sobre el ataque del sistema inmune del hospedador, así como aumentando la permeabilidad de la pared a las drogas antiparasitarias.

Los resultados obtenidos luego del tratamiento profiláctico no fueron tan contundentes, al igual que en experimento anterior, tampoco hubieron diferencias en cuanto al número de quistes colectados. Si bien los parásitos colectados en el grupo Lufenuron-Albendazol fue menor ésta tendencia no alcanzó a ser significativa.

En cuánto al efecto de los tratamientos en el crecimiento de los quistes, se observó una reducción del tamaño en aquellos quistes que fueran tratados con Albendazol y con Lufenuron-Albendazol. La no existencia de diferencias en el crecimiento entre estos dos últimos grupos no se observó. Una de las razones que pudieron haber contribuido a que no fuera posible visualizar este efecto sinérgico, es el menor desarrollo observado de los parásitos en este experimento (mostrados en el grupo control). El diámetro de los quistes en el grupo control fue menor (promedio 3.1mm) al observado en la experiencia anterior (promedio 5.4mm). Estas diferencias nos hace perder sensibilidad cuándo se quiere ver una reducción del tamaño ya que implica limitaciones en la propia unidad de medida. Esta diferencia del tamaño de los quistes entre los diferentes experimentos podría atribuirse a características del propio material parasitario el cual es muy diferente estandarizar de antemano el potencial de crecimiento ya que partimos de poblaciones diferentes de parásitos. Otra razón podría que podría explicar el menor crecimiento obtenido en estos quistes es la cepa de ratones utilizada, si bien las cepas CD1 (exogámica) y Balb/c (endogámica) han sido largamente utilizadas como modelo de hidatidosis secundaria. Cuándo se evaluó la estructura de la pared de los quistes por cromatografía en capa fina no fue posible establecer diferencias en la concentración de IP6 en los distintos tratamientos.

Por último, se ensayó por primera vez, la incorporación de Inositol marcado radioactivamente, como una alternativa para determinar viabilidad y actividad metabólica de los quistes obtenidos al final de la experiencia .

Este modelo fue diseñado en base al conocimiento de que el parásito necesita incorporar inositol del medio para la síntesis del IP6 que es depositado luego en su capa laminar.

Este modelo demostró ser útil para diferenciar parásitos vivos de muertos, ya que en sólo 48 horas de incubación los parásitos vivos son capaces de tomar el inositol marcado y depositarlo en su pared en forma de IP6. Por otra parte, establece que estos parásitos son metabólicamente muy activos a diferencia de los que se observa microscópicamente.

Cuando quisimos comparar la actividad metabólica de los parásitos sometidos a diferentes tratamientos, no se pudieron observar diferencias significativas entre los grupos.

9. CONCLUSIONES

El presente estudio describe por primera vez, el uso potencial de un inhibidor del crecimiento de insectos, Lufenuron como droga alternativa en el tratamiento de la hidatidosis.

Del mismo se desprende que esta droga genera alteraciones a nivel de la pared de los quistes totalmente desarrollados, basadas en la modificación de la disposición de las fibras en la capa laminar y en la concentración de IP6 en la misma. Sin embargo, en combinación con Albendazol el Lufenuron afectó el crecimiento de QH establecidos probablemente por afectar los mecanismos asociados a la generación de la capa laminar.

Finalmente, en este trabajo se describe una nueva metodología para evaluar actividad metabólica de un quiste totalmente desarrollado, mediante la incorporación de inositol marcado radiactivamente.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Acha, P, Szyfres, B (2003). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. *Publicación científica y Técnica Organización Panamericana de la Salud*. N° 580 pp 195-211
2. Anadol, D y col (2001). Treatment of Hydatid Disease. *Pediatric Drugs* 3(2):123-125.
3. Atías, A (Mayo 1999) *Parasitología Medica*. Santiago de Chile. Publicaciones Técnicas Mediterránea Ltda Cap 39 pp 338-357.
4. Aydin, M (2003). Multiple infected hydatid Cyst treated with Albendazole *Turk J.medical Sci* 33 393-395.
5. Breijo, M y col (1998). Echinococcus Granulosus: An Intraperitoneal Diffusion Chamber Model of Secondary Infection in Mice. *Experimental Parasitology*; Vol 90 (3):270-275
6. Cabrera, P.A y col (2003). National prevalence of larval echinococcosis in Sheep in slaughtering plants *Ovis aries* as an indicator in control programmes in Uruguay. *Acta Tropica* 85:281-285
7. Cabrera P.A y col (2002). Control of Echinococcus granulosus in Uruguay: evaluation of different treatment intervals for dogs. *Veterinary parasitology* 103: 333-340.
8. El-On Joseph (2003). Benzimidazole treatment of cyst echinococcosis. *Acta Tropica* 85 243-252
9. Graf.J-F (1999). The role of insect growth regulators in the control of ectoparasites. *Scientific Comunication Novartis Animal Health*. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology 17 International Conference 15-19 August Copenhagen pp1-5
10. Gurri,J (1963). Vitalidad y evolutividad de los escólices hidáticos in vitro e in vivo. *Anales de la Facultad de Medicina de Montevideo* 48,(372-381).
11. Irigoien, F *et al*; (2002). myo-inositol hexakisphosphate is a major component of an extracellular structure in the parasitic cestode Echinococcus granulosus. *Biochemical Journal* 362 (297-304)
12. Lapage, G; GIBSN, T.E; Beesley W.N, (1971). *Parasitología Veterinaria México* CECSA.
13. Larrieu, E; *et al* (2001). Perspectivas para el control de la hidatidosis en áreas continentales. *Veterinaria Argentina* Vol XVIII. N°175 pp 361-372.
14. Larrieu, E *et al* (2001). Ovine Echinococcus granulosus transmission Dynamics in the province of Rio Negro, Argentina, 1980-1999. *Vetrinary Prsitolology* 98 (263-272).
15. Larrieu, E *et al* (2000). Portadores asintomático de hidatidosis: epidemiología, diagnóstico y tratamiento. *Revista Panamericana de Salud Publica* 8(4):250-256.
16. Menezes da Silva.A (2003). Hydatid cyst of the liver-criteria for the selection of appropriate treatment. *Acta Tropica* 85: 237-242.
17. Schenker, R (1999). Effects of luffenuron on the development of the cat flea. *Scientific Comunication Novartis* 18

11. Irigoin, F *et al*; (2002). myo-inositol hexakisphosphate is a major component of an extracellular structure in the parasitic cestode *Echinococcus granulosus*. *Biochemical Journal* 362 (297-304)
12. Lapage, G; GIBSN, T.E; Beesley W.N, (1971). *Parasitología Veterinaria México CECSA*.
13. Larrieu, E; *et al* (2001). Perspectivas para el control de la hidatidosis en áreas continentales. *Veterinaria Argentina* Vol XVIII. Nº175 pp 361-372.
14. Larrieu, E *et al* (2001). Ovine *Echinococcus granulosus* transmission Dynamics in the province of Rio Negro, Argentina, 1980-1999. *Vetrinary Prasitology* 98 (263-272).
15. Larrieu, E *et al* (2000). Portadores asintomático de hidatidosis: epidemiología, diagnóstico y tratamiento. *Revista Panamericana de Salud Publica* 8(4):250-256.
16. Menezes da Silva.A (2003). Hydatid cyst of the liver-criteria for the selection of appropriate treatment. *Acta Tropica* 85: 237-242.
17. Schenker, R (1999). Effects of lufenuron on the development of the cat flea. *Scientific Comunication Novartis Animal Health. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology 17 International Conference. August 15-19 Copenhagen* pp 13-18
18. Steers, N.J; Rogan, M:T (2001). In-vitro susceptibility of hydatid cyst of *Echinococcus granulosus* to nitric oxide and the effect of the laminated layer on nitric oxide production. *Parasite Immunol* Aug 27;23(8):411-417.
19. Torgerson, P.R, Carmona C., Bonifacino, R (2000). Estimating the economic effects of cystic echonococcosis: Uruguay, a developing country with upper-middle income. *Annals of Tropical Medicine Parasitology* Vol 94 Nº 7, 703-713.
20. Thompson R.C.A (1995). Biology and systematics of *Echinococcus* Chapter 1, In "Echinococcus and Hydatid disease" (R:C:A Thompson and A:J Lymbery, Eds.), pp.1-37. CAB International, Oxfordshire, UK.



11. ANEXO

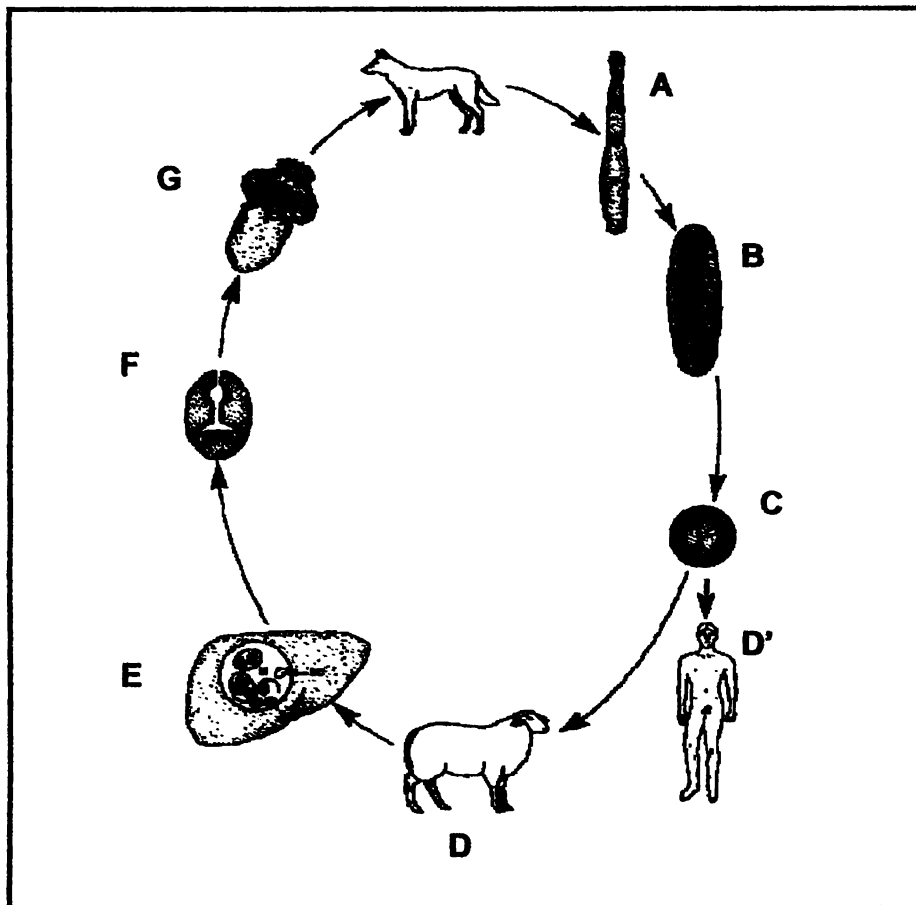


Figura 1: Ciclo evolutivo y mecanismo de transmisión de *E. granulosus*. A Helminto adulto que se aloja en en intestino delgado del perro, B proglótido grávido que es eliminado con las heces; C Huevo expulsado al exterior (oncosfera), D y D' Hospedero intermediario Herbívoro; el hombre participa como hospedero intermediario accidental, E Quiste hidático, alojado en las vísceras de los hospederos intermediarios, F Protoescolices, que son la forma infectante para el hospedero definitivo, G Protoescolices evaginados.

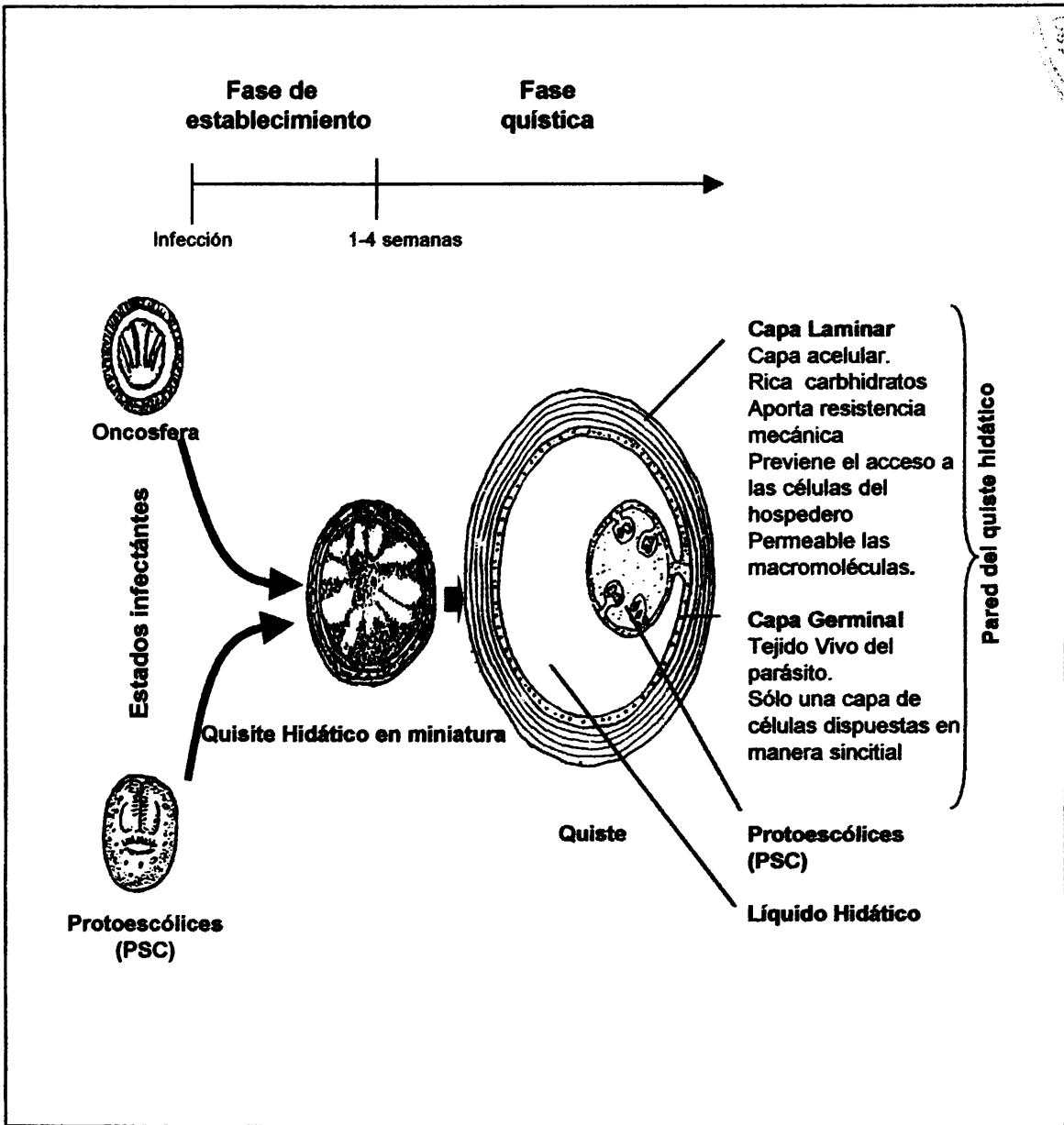


Figura 2: Vías de desarrollo de la infección hidática en hospederos intermedios. Note que el desarrollo de quistes hidáticos miniatura se alcanza tanto a partir de oncosfera (A) o PSC (Infección hidática secundaria B). El establecimiento de la infección se alcanza en 2 a 4 semanas y la misma se prolonga hasta la muerte del hospedador.

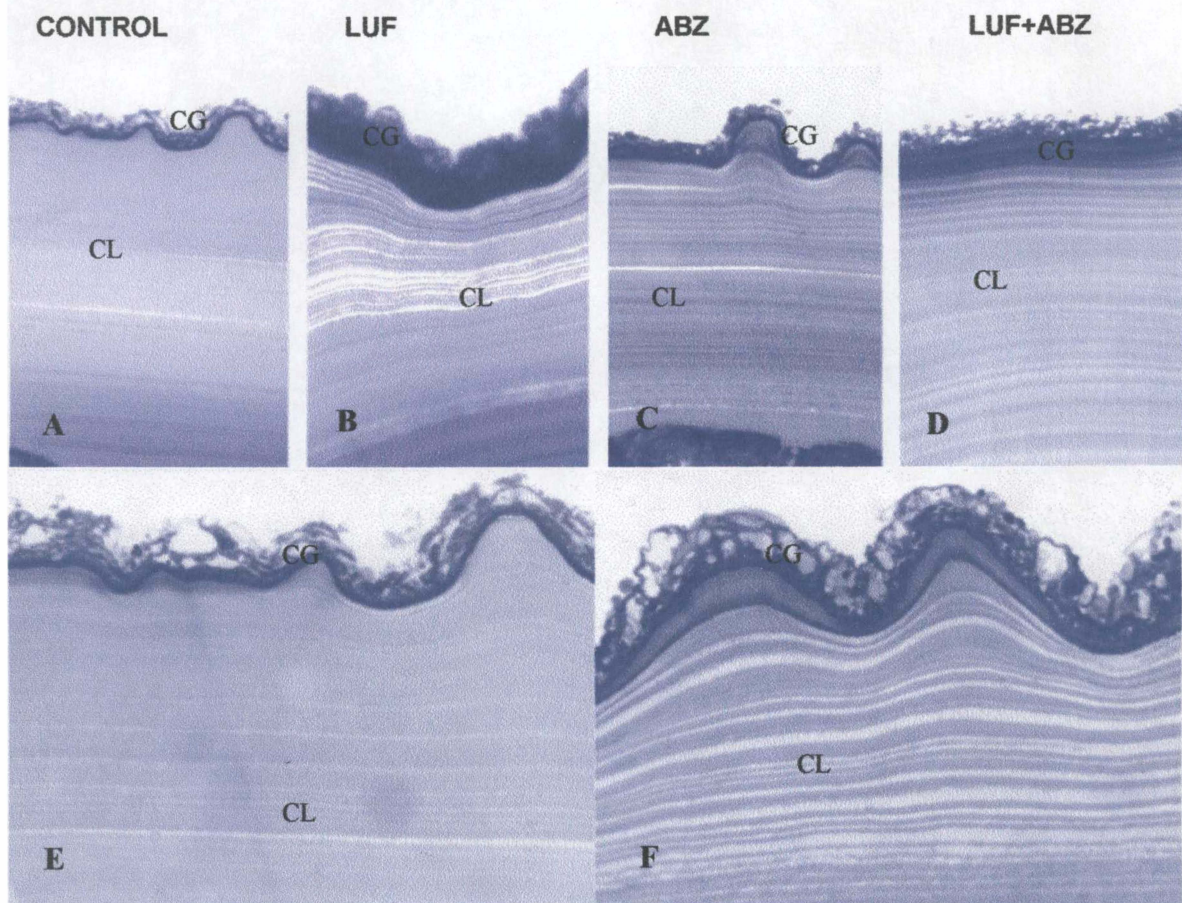


Figura 3: *Evaluación del efecto terapéutico del Lufenuron y su combinación con Albendazol, sobre las paredes de los quistes, analizadas por microscopía óptica.* Se muestra la estructura de la pared de quistes del grupo control (A) y de los grupos tratados con Lufenuron (B), Albendazol (C), Lufenuron + Albendazol (D) coloreados con azul de Toluidina. (aumento de 20x). En los tres grupos tratados se observan cambios en la disposición de las fibras de la capa laminar (CL) y vacuolas en la capa germinativa (CG). En los cuadros E-F se comparan las paredes de quistes del grupo Control (E) y Lufenuron (F) (aumento de 50X) .

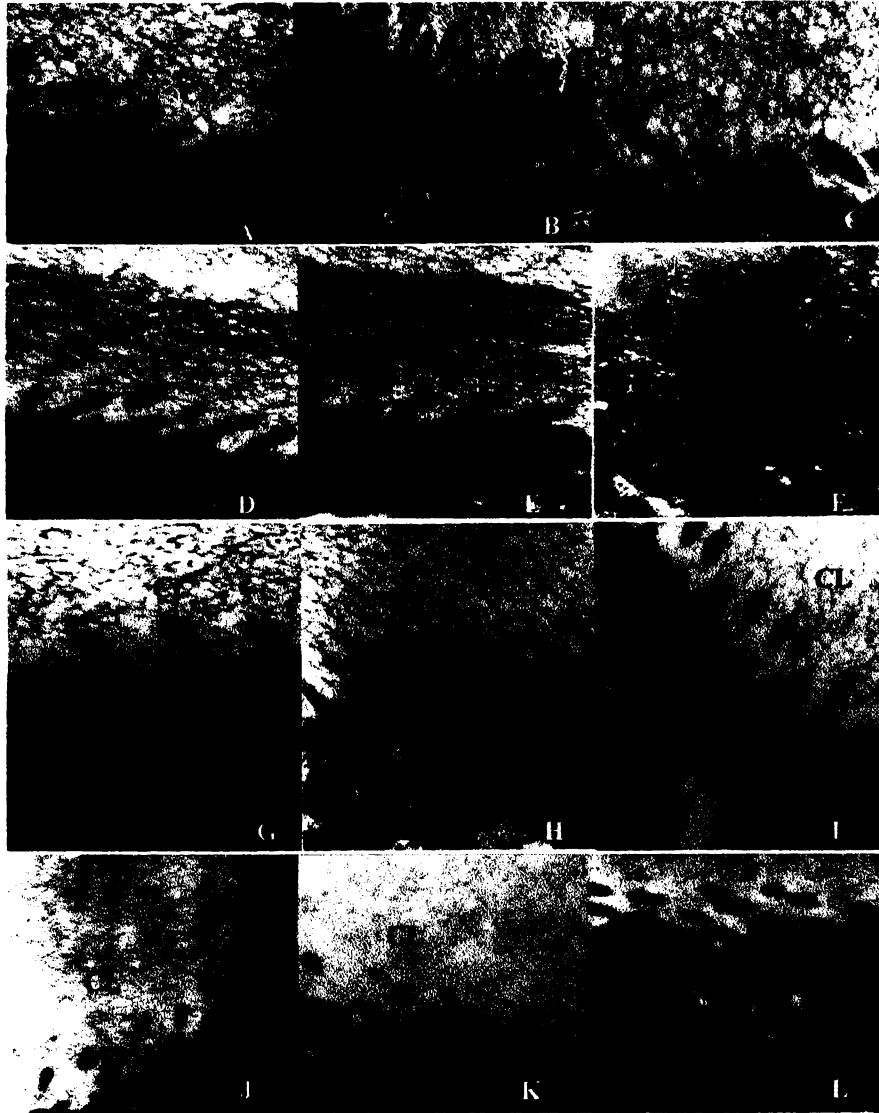


Figura 4: *Evaluación del efecto terapéutico del Lufenuron y su combinación con albendazol sobre las paredes de los quistes, evaluadas por microscopía electrónica de transmisión.* Estructura de la pared de los quistes hidáticos control y tratados observadas a 18000 aumentos. Capa germinativa (CG), capa laminar (CL), microtrichias (MT). A,B,C Paredes de quistes del grupo control. Nótese, la disposición homogénea de las fibras de la CL y el aspecto de las MT. D,E,F Paredes de quistes tratados con Albendazol. Se observan MT mas pequeñas y una distribución menos uniforme de las fibras de la CL. G,H,I Paredes de quistes del grupo Lufenuron. Se observan fibras menos electrondensas en la CL y menor número de microtrichias. J,K,L Paredes del grupo Lufenuron Albendazol Nótese una importante disminución en las electrondensidad de las fibras de la CL y MT mas pequeñas y aplanadas.

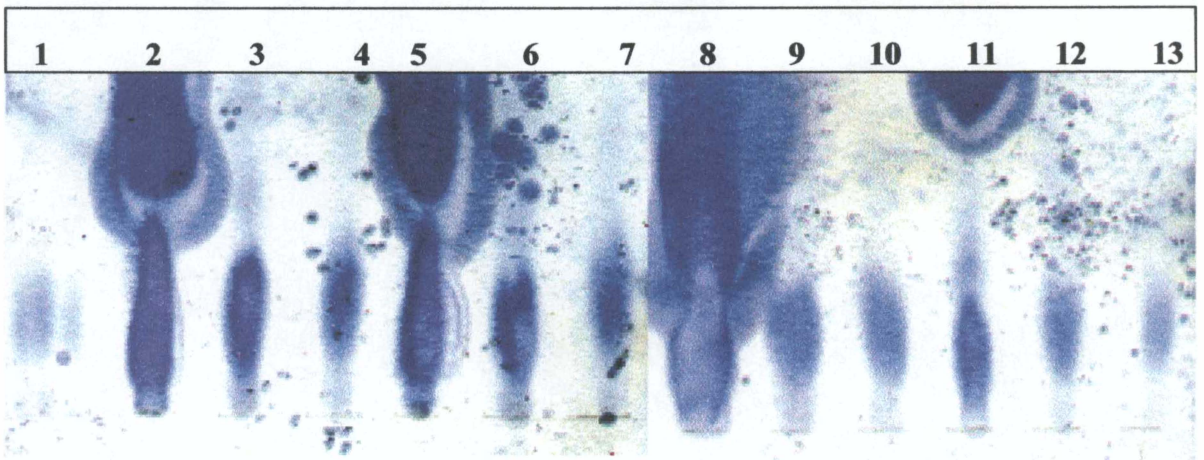


Figura 5: Análisis del contenido de IP6 en la pared de los quistes hidáticos murinos establecidos, tratados con Lufenuron (LUF), Albendazol (ABZ) y Lufenuron+Albendazol (LUF+ABZ). Se observa una menor señal en los extractos de los grupos LUF y LUF+ABZ, en este último es donde se aprecia la mayor reducción del contenido de IP6. En el Carril 1 solución standart de IP6 2 mM, Carril 2,3,4 extracto de pared del grupo Control puro; 1: 10 y 1:50 respectivamente. Carril 5,6,7 extracto de IP6 del grupo ABZ, puro 1: 10 y 1:50 respectivamente. Carril 8,9,10 extracto de paredes del grupo LUF, puro 1: 10 y 1:50 respectivamente. Carriles 11,12,13 extracto de paredes del del grupo LUF+ABZ puro, 1: 10 y 1:50 respectivamente.

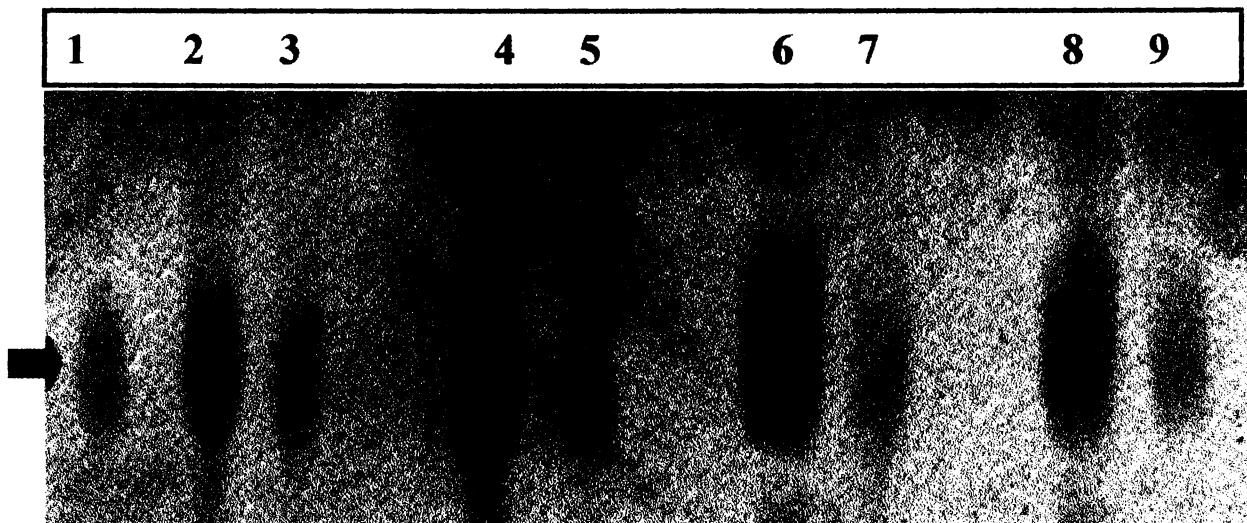


Figura 6: Análisis del contenido de IP6 en la pared de quistes hidáticos murinos sometidos a los tratamientos profilácticos con Lufenuron (LUF), Albendazol (ABZ) y Lufenuron+Albendazol (LUF+ABZ). Se observa una leve diferencia en la señal obtenida en los extractos del grupo LUF y LUF+ABZ Carril 1 solución 2 mM de IP6, Carril 2-3 extracto de pared de quistes del grupo Control, Carriles 4-5 extractos de pared de quistes del grupo ABZ. Carriles 6-7 extractos de pared de quistes del grupo LUF. Carriles 8-9 extractos de pared de quistes del grupo LUF+ABZ. La flecha indica el depósito del IP6 contenido en las paredes..

Cuadro I Evaluación del efecto del tratamiento terapéutico sobre el número y tamaño de Quistes Hidáticos (QH) colectados.

Tamaño (mm)	GRUPOS			
	CONTROL	ABZ	LUF	LUF+ABZ
30	1			
29				
28				
27	1			
26				
25		1		
24				
23				
22	3	1		
21				
20	3	3		
19	2			1
18	2			
17	1	1		
16	2	1		1
15		6	5	2
14	5	5	3	
13	2	1	8	3
12	6	4	11	5
11	5	4	4	2
10	25	12	18	14
9	16	11	12	10
8	19	12	21	10
7	19	24	27	33
6	20	23	17	13
5	72	49	64	50
4	53	61	73	63
3	61	62	71	77
2	45	54	51	71
1	50	54	26	97
TOTAL	413	389	411	452

Aquí se muestra la distribución del tamaño de los quistes colectados en cada grupo. Se puede apreciar que los quistes de mayor tamaño se hallan en los ratones del lote Control y Albendazol (ABZ). En el grupo Lufenuron+Albendazol (LUF+ABZ) es donde se halló el mayor número de quistes menores a 3mm.

Cuadro II Análisis estadístico del efecto del tratamiento terapéutico sobre el número y tamaño de Quistes Hidáticos (QH) colectados

A)

Grupo	Nº de animales	Nº total de quistes colectados por grupo	Media del número quistes por animal	Media del tamaño de los quistes colectados
CONTROL	18	413	23 ± 18	5.4 ± 4.2
ABZ	12	389	32± 23	4.8 ± 3.7
LUF	12	411	27±33	5.1± 3.1
ABZ+LUF	16	452	29±19	3.9 ± 2.9

B)

GRUPO	CONTROL	ABZ	LUF	LUF+ABZ
CONTROL	-----	0.0283	0.8761	0.0000
ABZ	0.0283	-----	0.0111	0.0004
LUF	0.8761	0.0111	-----	0.0000
LUF+ABZ	0.0000	0.0004	0.0000	-----

En el cuadro IA se observa que el número de quistes obtenido por animal fue similar, existiendo diferencias en el tamaño promedio de los quistes obtenidos en cada grupo. En el cuadro IB se observa la comparación entre los grupos del tamaño de los quistes obtenidos utilizando Wilcoxon Rank Test. Valores de $p < 0.0087$ muestran diferencias significativas entre los grupos. Obsérvese que la combinación de las drogas produjo una reducción mayor en el tamaño de los quistes.

Cuadro III Evaluación del efecto del tratamiento profiláctico sobre el número y tamaño de Quistes Hidáticos (QH) colectados.

TAMAÑO (MM)	CONTROL	ABZ	LUF	LUF+ABZ
15	1			
14				
13				
12				1
11				
10	2		3	
8	2		5	1
7	10		15	2
6	21		25	
5	131	32	100	25
4	127	61	86	48
3	165	129	146	106
2	212	295	184	238
1	103	207	76	166
Total	774	724	640	587

Aquí se puede apreciar que hay un menor número de quistes colectados en el grupo tratado con Lufenuron+Albendazol (LUF+ABZ).

Cuadro IV Análisis estadístico del efecto del tratamiento profiláctico sobre el número y tamaño de Quistes Hidáticos (QH) colectados.

A)

Grupo	Nº animales grupo	Nº total de quistes por animal	Media del número de quistes	Media del tamaño de los quistes colectados
CONTROL	10	774	77.4 ± 41.4	3.13 ± 1.55
ABZ	12	724	60.3 ± 66.7	2.19 ± 1.07
LUF	10	640	64 ± 39.4	3.2 ± 1.60
ABZ+LUF	11	587	53.3 ± 23.2	2.23 ± 1.19

B)

	CONTROL	ABZ	LUF	LUF+ABZ
CONTROL	-----	0.0000	0.683	0.0000
ABZ	0.0000	-----	0.0000	0.8223
LUF	0.683	0.0000	-----	0.0000
LUF+ABZ	0.0000	0.8223	0.0000	-----

En el cuadro IV A puede apreciarse que el grupo Lufenuron+Albendazol obtuvo un menor promedio en el número de quistes colectados por animal. Por otra parte, en los grupos Albendazol y Lufenuron + Albendazol se observó un menor tamaño promedio en los quistes colectados.

En el cuadro IVB se muestra el análisis estadístico que compara el tamaño de los quistes obtenidos en cada grupo, mediante el test de Wilcoxon. Las diferencias entre los grupos son significativas cuando $p < 0.0087$ (test de Bonferroni).

Cuadro V Evaluación de los niveles del incorporación de inositol 3H en la pared de quistes sometidos al tratamiento profiláctico.

LOTE DE QUISTES	A) NIVEL DE INOSITOL 3H EN EL SOBRENADANTE DE INCUBACIÓN (CCPM)	B) NIVEL DE INOSITOL 3H RECUPERADO DE LA PARED DE LOS QUISTES LUEGO DEL TRATAMIENTO CON FITASA.
Control Vivo	16237	70951
Control Muertos	211207	1459
ABZ	21926	411145
LUF	51495	262833
LUF+ABZ	38978	283760

Aquí puede apreciarse a los quistes hidáticos murinos sometidos a los tratamientos profilácticos con Lufenuron (LUF), Albendazol (ABZ) y Lufenuron+Albendazol (LUF+ABZ). En A se mide el nivel de inositol libre post incubación, se observa una menor incorporación en el lote Control Muerto. B) Se aprecia niveles de incorporación de inositol en las paredes de los quistes de todos los grupos tratados.