

Caracterización de la proteína microtubular de diferentes helmintos parásitos. Sus implicancias en el modo de acción de los benzimidazoles antihelmínticos

Scarcella Silvana: Veterinario | **Ceriani Carolina:** Doctor en Bioquímica, Investigador Adjunto CONICET | **Rodríguez Julio A.:** Doctor en Bioquímica, Investigador Adjunto CONICET | **y Solana Hugo D. :** Médico Veterinario, Doctor en Ciencia Animal, Profesional Principal CIC | Lab. de Biología Celular y Molecular, Fac. Cs. Veterinarias, UNICEN, Campus Universitario, Tandil, Argentina. E-mail: hsolana@vet.unicen.edu.ar

REDVET: 2007, Vol. VIII Nº 6

Recibido: 09 Mayo 2007 / Referencia: 060712_REDVET / Aceptado: 30 Mayo 2007 / Publicado: 01 Junio 2007

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060607.html> concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060607/060712.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®.
Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> y con REDVET®
- <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

Resumen

Los antihelmínticos benzimidazoles (BZD) desestabilizan el equilibrio tubulina-microtúbulo originando en el parásito una pérdida de la homeostasis celular, desprendimiento y muerte. Su baja toxicidad se explica por una mayor afinidad por la tubulina del parásito, especialmente en cestodes y nematodos, comparada con la observada para tubulina de mamífero. Al ser tubulina una proteína altamente conservada en la escala zoológica se hace necesario investigar las probables causas de esa diferente afinidad. El objetivo del presente trabajo fue comparar ciertas características moleculares de tubulina de trematodes (*Fasciola hepatica*), cestodes (*Moniezia expansa*), nematodes (*Ascaris suum*) y

tubulina purificada de cerebro de rata. Se utilizaron técnicas electroforéticas (PAGE) e inmunoquímicas con anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra α y β tubulina. Los resultados demostraron que aunque en diferente cuantía mientras que fue factible la detección de las diferentes tubulinas en mamíferos, cestodes y nematodos, en ninguno de los casos se detectó la tubulina de *F. hepatica*. Esto tiene implicancias directas en el entendimiento de las diferentes susceptibilidades de cada especie a estos fármacos, lo cual puede ser un primer paso hacia la comprensión de la actividad farmacológica de estas drogas.

Palabras Claves: antihelmíntico | parasito | tubulina | benzimidazole

Summary

The anthelmintic benzimidazoles cause a destabilization of tubulin-microtubule equilibrium which induces to a lost of the cellular homeostasis, detaching and death of the parasite. They have a low toxicity on the infested animal, explained as a higher affinity

for the parasite tubulin, mainly that of cestodes and nematodes. From an evolutionary point of view, tubulin is a highly conserved protein, thus in order to understand the probable causes for that difference in affinity, it is necessary to further investigate the microtubular protein

at a molecular level. The aim of this project was to compare certain molecular characteristics of tubulin from trematodes (*Fasciola hepatica*), cestodes (*Moniezia expansa*), nematodes (*Ascaris suum*) and purified rat brain tubulin. For this purpose electrophoretic techniques (PAGE) followed by immunochemistry using specific monoclonal antibodies against α and β tubulin were used. Results showed that it was possible to detect tubulin spots, but not

in the same amount, in mammals, cestodes and nematodes. Under our experimental conditions it was not possible to detect *F. hepatica* tubulin. This could help to understand the differences in the answer to the anthelmintic drugs and also to learn something about to the pharmacological activity of these.

Keywords: anthelmintic | parasite | tubulin | benzimidazole

Introducción

Las infecciones causadas por helmintos constituyen un importante problema médico sanitario tanto en humanos como en animales domésticos. En el ganado, las parasitosis en general, ocasionan serias pérdidas económicas particularmente en áreas donde se practica el pastoreo extensivo (Köler, 2001). Es sabido que el parasitismo en todo el mundo es una de las principales causas de pérdidas económicas en producción animal (Prichard, 1994). Una porción relevante de las pérdidas económicas causadas por parasitismo en producción animal, está dada por la inversión en medidas de control. El fracaso en el control antiparasitario, basado casi exclusivamente en quimioterapia, tiene una importancia económica de enorme trascendencia en países como Argentina, donde las condiciones climáticas y de explotación semiextensiva favorecen una alta incidencia del parasitismo. Si bien se han desarrollado diferentes estrategias para contrarrestar el efecto nocivo de los parásitos helmintos (medidas de manejo, control biológico, selección de animales resistentes, etc.), el control químico continúa siendo una herramienta fundamental en la lucha contra las parasitosis.

Los benzimidazoles antihelmínticos (BZD) desestabilizan el equilibrio tubulina-microtúbulo originando en el parásito una pérdida de la homeostasis celular, con el consecuente desprendimiento y muerte. Su mecanismo de acción depende de la presencia sostenida de la droga activa en contacto con su receptor intracelular, la β tubulina (Lacey, E. (1990); Lanusse et al (1993)).

La capacidad de unión de los BZD a tubulina de mamífero in vitro (Friedman P. and Platzner E. (1978); Ireland C. et al (1979)) reafirma que su mecanismo de acción es por su efecto antimicrotúbulo pero no responde al por qué de la naturaleza de la toxicidad selectiva de estas drogas y de la naturaleza precisa de su efecto in vivo (Gull K. et al (1987)). Al respecto, la inhibición de la reacción de tirosinación de α tubulina en cerebro de rata que se observa en presencia de albendazole (ABZ) (uno de los principales antihelmínticos benzimidazoles de amplio uso en medicina humana y veterinaria) sería debido al efecto sobre el estado de ensamblamiento alterando el equilibrio existente entre la forma polimerizada (microtúbulo) y la forma soluble (tubulina) (Solana H.D. et al. (1998)). Aportando en el mismo sentido, recientemente en nuestros laboratorios se demostraron en ratas ciertos aspectos embriotóxicos del antihelmíntico benzimidazólico ABZ sulfóxido (ABZSO) manifestándose no solo su toxicidad fetal sino también sus efectos a nivel placentario (Teruel M.T et al (2003)).

En los últimos años se ha avanzado con respecto a la ubicación de los microtúbulos y a la variedad de funciones que realizan dentro de la célula parasitaria. Se ha demostrado su presencia en protoescolices de *Equinococcus granulosus* (cestode) localizados en la región de la ventosa y en el canal de invaginación. El tracto gastrointestinal de *Ascaris suum* (nematodo) está tapizado por una capa simple de células cilíndricas las cuales a diferencias

de otras especies, no están sometidas a reemplazos continuos por nuevas células. Esta participación de los microtúbulos también se describe en *Ascaridia galli* demostrándose además su presencia en nervios y células de la dermis. En adultos de *Fasciola hepatica* (tremátodo) se ha determinado que sus microtúbulos están involucradas en varios procesos dentro del parásito. Dichas organelas se localizan en el sinscicio y en los cuerpos celulares del tegumento y sus conexiones citoplasmáticas con la superficie del sinscicio (Fairweather I. and Boray J.C.(1999)).

En general, los nematodos o cestodos son muy sensibles a este tipo de droga y aún hoy es discutido su efecto en trematodos. Así, la dosis de BZD que es altamente eficaz para eliminar nematodos o cestodos, debe aumentarse considerablemente para obtener una buena eficacia clínica contra el trematode *Fasciola hepatica* (McKellar, Q.; Scott, E. (1990); Soulsby, E. (1987)).

Es sabido que la actividad metabólica mediada por P450 es menos relevante en algunos helmintos, en comparación con mamíferos (Precious W.Y. and Barrett J. (1989)). En consecuencia, las reacciones de fase I se llevarían a cabo fundamentalmente a través del sistema enzimático FMO (Douch P. and Buchanan L. (1979)). Utilizando ambas vías, *A. suum* (nematode), *F. hepatica* (trematode) y *M. expansa* (cestode) son capaces de metabolizar ABZ a ABZSO siendo esta metabolización de diferente magnitud dependiendo del parásito analizado pudiendo correlacionarse directamente dicho fenómeno con la eficacia farmacológica de este tipo de drogas frente a cada especie estudiada (Solana H.D, et al (2001)).

La eficacia antiparasitaria de todos los BZDs depende del tiempo que perdura en plasma la concentración tóxica para el parásito. En el caso de ABZ éste es rápidamente metabolizado en el hígado a ABZ sulfóxido (ABZSO) siendo éste el que mayormente genera el efecto antiparasitario para posteriormente ser metabolizado a la forma inactiva ABZ sulfona (ABZSO₂) eliminándose mayormente de esta forma (Marriner S.(1980)) siendo inhibida su metabolización por ciertos compuestos (Lanusse C. et al (1993), Solana H.D., et al (2000)). Dado que su baja toxicidad comparada con la observada para tubulina de mamífero se explicaría por una mayor afinidad por la tubulina del parásito, especialmente en cestodos y nematodos, y al ser tubulina una proteína altamente conservada en la escala zoológica se hace necesario investigar las probables causas de esa diferente afinidad.

El objetivo del presente trabajo fue comparar con tubulina de mamífero ciertas características moleculares de la proteína tubulina proveniente de parásitos de interés en medicina humana y veterinaria. Se analizaron tremátodos (*Fasciola hepatica*), cestodos (*Moniezia expansa*), nematodos (*Ascaris suum*) y tubulina purificada de cerebro de rata.

Para la inmunodetección se utilizaron técnicas electroforéticas en geles de poliacrilamida (PAGE) e inmunoquímicas con anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra α y β tubulina.

Materiales y Métodos

Animales

Se utilizaron cerebros de ratas provistas por el bioterio de la Institución y especímenes adultos de *Moniezia expansa*, *Ascaris suum* y *Fasciola hepatica*.

Moniezia expansa: Obtenidas de ovinos adultos, lavadas en buffer fosfato de sodio 0,01 M, pH 7,4 (BF) a 37-38 °C y así transportadas hasta el laboratorio.

Fasciola hepatica: Obtenidas de ovejas inoculadas oralmente con 200 metacercarias. Luego de 16 semanas, posteriormente a la confirmación de la presencia de huevos por análisis de materia fecal y determinación de alteración hepática por cuantificación de actividad sérica de

GLDH (Glutamato deshidrogenasa) y γ GT (γ Glutamyl transferasa); las fasciolas adultas fueron extraídas del conducto biliar e hígado y transportadas en forma similar a las especies anteriores.

Ascaris suum: Obtenidos de intestinos de lechones faenados en el matadero local, procesados y transportados en forma similar a las tenias ovinas.

Preparación de extractos solubles

Las muestras biológicas fueron homogeneizadas con un Ultraturrax Ystral GmbH, en 2 volúmenes de una solución que contenía en el caso de cerebro de rata: buffer PIPES 0,1 M (pH 6,94) y en el caso de los diferentes parásitos: buffer fosfato 0,01 M (pH 7,0), sacarosa 0,24 M. El homogenato de cerebro de rata fue procesado para la obtención de tubulina en pureza (ver mas adelante). El homogeneizado de los diferentes parásitos fue centrifugado durante 60 min a 100.000 g a 4 °C en una ultracentrífuga Sorvall (Ultra Pro 80, rotor T880, USA). El sobrenadante obtenido (proteínas solubles citosólicas) fue utilizado para la provisión de la tubulina de las diferentes especies manteniéndolo a -80 °C hasta su uso.

Obtención de tubulina en pureza a partir de cerebro de rata

Se efectuó a partir de un homogenato de cerebro de rata en buffer PIPES 0,1 M (pH 6,94), realizando dos ciclos de ensamblamiento-desensamblamiento (*Esquema 1*) según la técnica de Murphy (12). La proteína microtubular de cerebro fue congelada en nitrógeno líquido y conservada a -80 °C hasta su uso. Posteriormente, la muestra en PIPES 0,1 M (pH 6,94) conteniendo KCl 0,25 M, se depositó sobre una columna de intercambio iónico (DEAE-Sephadex A-50) de 10 mm x 180 mm, previamente equilibrada con cinco volúmenes de PIPES 0,1 M (pH 6,94) conteniendo KCl 0,25 M, la velocidad de elución se reguló a 5 ml/h aproximadamente. La columna fue exhaustivamente lavada (10 volúmenes de cama) con PIPES 0,1 M (pH 6,94) conteniendo KCl 0,25 M. Posteriormente se realizó la elución de tubulina con PIPES 0,1 M (pH 6,94) KCl 0,5 M (dos volúmenes de cama). Todas las operaciones se efectuaron a 4 °C.

Electroforesis en Geles de SDS-Poliacrilamida (PAGE)

Las diferentes muestras a analizar fueron sometidas a PAGE al 10% en presencia de SDS según Laemmli (Laemmli, U.K. (1970)), utilizando una cuba de electroforesis vertical (Hoefer, USA). Se sembraron 14 μ l de citosol de *Ascaris suum* (16,8 mg/ml), 20 μ l de citosol de *Fasciola hepatica* (8,09 mg/ml), 20 μ l de citosol de *Moniezia expansa* (14,06 mg/ml) y 20 μ l de tubulina purificada de cerebro de rata (13,99 mg/ml). Los geles fueron teñidos con Coomassie Brilliant Blue R250 al 0,25% (p/v), o transferidos a nitrocelulosa mediante la aplicación del método de Towbin y col. (17) con un equipo de transferencia electroforética horizontal (Nova Blot Pharmacia). Se usó una cuba de transferencia semi-seca a 0.8 mA/cm² de gel durante 60 minutos en buffer Tris 48 mM, glicina 39 mM, 0,0375% SDS, 20% metanol (v/v). Las proteínas transferidas fueron visualizadas por tinción con Rojo Ponceau's (*Esquema 2*). Los geles no transferidos y coloreados fueron deshidratados entre films de celofán y digitalizados con un scanner (Vuego Scan Brisa 310P) con apoyo de un procesador Pentium.

Caracterización de las distintas poblaciones de tubulina

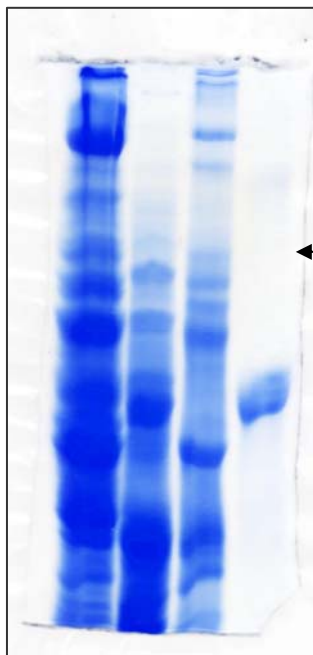
Para realizar el análisis cualitativo y cuantitativo de las distintas poblaciones de tubulina de las diferentes especies en estudio, se utilizaron técnicas de inmunoensayo con anticuerpos monoclonales (Osborn, et al (1982) 13) empleando anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra α -tubulina (DM1A, Sigma Immuno Chemicals N° T-9026) y β -tubulina (clone tub 2.1, Sigma Immuno Chemicals N° T-4026), utilizando como segundo anticuerpo una IgG

(molécula entera) anti-rata conjugada con peroxidasa (Sigma Immuno Chemicals N° A-9037) para posteriormente generar color por el agregado de una solución de 4-cloro-1naftol. La reacción se detuvo colocando las membranas en H₂O destilada y el color generado se observó dentro de los 15 a 30 min .

Las reacciones positivas fueron registradas por una Video Camera Module CCD SONY, digitalizadas por un frame Grabber (Pcplus provisto por Imaging Technology Inc., 512 x 512 pixeles), digitalizadas con scanner (Vuego Scan Brisa 310P) y procesadas con el software adecuado (ImagePro) en Pentium II-400 64Mb.

Resultados

La utilización de las metodologías empleadas en el presente trabajo permitió dilucidar ciertas características comparativas de la proteína tubulina de los helmintos en estudio frente a una tubulina purificada de cerebro de mamífero. En las corridas electroforéticas realizadas sobre geles de poliacrilamida al 10% (PAGE) el carril correspondiente a tubulina de mamífero purificada de cerebro de rata (DEAE-tubulina) (*Foto 1*, carril 4), fue utilizado no solo como referente de peso molecular (tubulina: 55 Kd), sino también como referente positivo a los diferentes anticuerpos monoclonales utilizados. Cuando se analizaron los diferentes carriles se determinó que el patrón electroforético obtenido para cada sobrenadante de alta velocidad fue particular a cada parásito analizado (*Foto 1*, carriles 1, 2 y 3) demostrando la presencia de diferentes proteínas para cada caso.



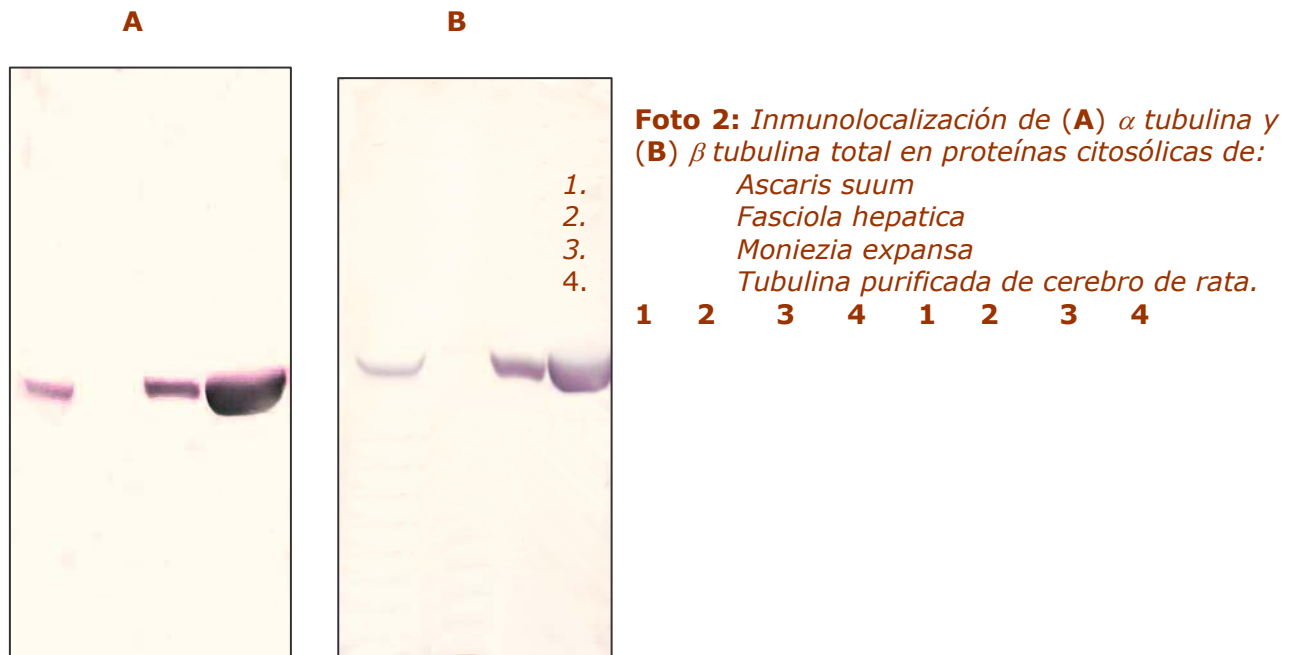
- 1: Proteínas citosólicas de *Ascaris suum*
- 2: Proteínas citosólicas de *Fasciola hepatica*
- 3: Proteínas citosólicas de *Moniezia expansa*
- 4: DEAE-tubulina de cerebro de rata

Tubulina

Foto 1: Electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% (PAGE).

Citosol de diferentes parásitos helmintos y DEAE tubulina de cerebro de rata. Tinción con Coomassie Brilliant Blue.

Los resultados del análisis inmunquímico demostraron que, con diferentes magnitudes, mientras fue factible la detección de α y β tubulina en mamíferos, cestodes y nematodos, en ninguno de los casos analizados se pudo detectar α o β tubulina en los sobrenadantes de alta velocidad correspondientes a *Fasciola hepatica* (*Foto 2*).



Discusión

A pesar de la relativa simplicidad de la estructura anatomofisiológica de los parásitos helmintos, ellos han podido hasta el presente salvar en mayor o menor grado las acciones tomadas por el hombre para su control. Dichas acciones las cuales el hombre dispone frente a una parasitosis son de variado origen, las más desarrolladas hasta el presente incluyen medidas de manejo, desarrollo de vacunas antihelmínticas, selección de animales naturalmente resistentes y control biológico, entre otros, y para ello existe abundante información que profundiza en cada uno de estos promisorios campos de investigación, sin embargo, el control químico de los parásitos dado su elevado margen terapéutico, su disponibilidad, y en la mayoría de los casos, su bajo costo, continúa siendo una de las herramientas más utilizadas hasta el presente. Además, la intensificación de los sistemas de producción animal ha dado lugar a una dependencia casi exclusiva de la quimioterapia, siendo hoy el desarrollo de resistencia de diferentes géneros parasitarios a la acción de diversos grupos de sustancias químicas, una seria amenaza para los sistemas de producción animal.

Desde los inicios del conocimiento que el mecanismo de acción primario de los BZD se desencadena a partir de la despolimerización de los microtúbulos, se ha demostrado que este tipo de drogas es capaz de inhibir la polimerización de tubulina de ciertos parásitos (Dawson, et al (1984)) sin aparentemente afectar los microtúbulos del hospedador. En el caso de *Ascaridia galli*, se conoce además que el análisis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) sugiere que su principal proteína microtubular no es idéntica a la tubulina de células de mamífero (Ireland, C.; et al. (1982)). Esa supuesta toxicidad selectiva de los BZD para los nematodos podría ser debida entonces a esta diferencia entre mamíferos y nematodos.

Mientras que las tubulinas de todas las fuentes estudiadas hasta la fecha son cerradamente relacionadas, ellas no son idénticas. Tang y Prichard hallaron que las diferentes isoformas de tubulinas en *Nippostrongylus brasiliensis* y en cerebro de rata varían mayormente en número (Tang, L.; Prichard, R. K. (1988)). Por su parte Enos y Coles han demostrado que la migración electroforética de tubulina de *Caenorhabditis elegans* en SDS-PAGE es similar pero no idéntica a la tubulina de cerebro porcino. Los inmunoensayos con anticuerpos anti-

tubulina determinaron que la banda correspondiente a β tubulina migra posterior a aquella de mamífero y que en el caso de analizar la tubulina de cepas resistentes a benzimidazoles, mientras que la banda correspondiente a α tubulina se mantiene en estrecha relación de migración electroforética con la correspondiente a cerebro de cerdo, la banda correspondiente a β tubulina tiene un comportamiento electroforético diferente (Enos, A.; Coles, G.C. (1990)). Por otro lado, en el caso de *Haemonchus contortus* la comparación entre cepas resistentes y sensibles a benzimidazoles analizadas en SDS-PAGE e inmunotransferencia no arrojan evidencias en diferencias en el contenido de tubulina entre ambas cepas aunque sí existen manifiestas diferencias en la capacidad de unión de los BZD a dicha molécula (Lubega, G.; Prichard, R. (1990)).

En el caso de tremátodos como *Fasciola hepatica* y sobre la base de la inmunodetección de tubulina, se conoce que sus microtúbulos están involucrados en varios procesos dentro del parásito. En consecuencia con esto debería esperarse que *F. hepatica* fuera susceptible al efecto de los BZD pero dichas drogas son relativamente inactivas contra esta especie de parásitos (Campbell, W. (1990); Van den Bossche, et al (1982)) sugiriendo que la tubulina en *F. hepatica* puede ser diferente en algunos aspectos a la que se distribuye en cestodes y nematodos (Stitt, et al (1992)).

El hallazgo que *F. hepatica* es susceptible a un derivado benzimidazólico como triclabendazole y que a su vez dicha droga tenga muy poca eficacia contra los otros géneros parasitarios (Coles, G.C. (1986)) podría ser debido a un diferente sitio de unión a la molécula de tubulina del tremátodo. Esta idea se apoya en la observación que triclabendazole no compite con colchicina por el sitio de unión a tubulina, mientras los otros benzimidazoles antihelmínticos sí lo hacen (Fetterer, R. (1986)).

En el caso en particular de *F. hepatica* la proteína tubulina ha sido localizada y parcialmente caracterizada a través de técnicas de inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo monoclonal que permitió además su visualización por inmunotransferencia como una única banda de 54 Kd (Tang L.; et al (1988)). La negatividad a la reacción inmunoquímica obtenida en el presente trabajo utilizando un diferente anticuerpo monoclonal podría explicarse entre otras causas probables a diferencias en la estructura cuaternaria de la proteína tubulina del trematode no permitiendo la exposición del epítipo correspondiente o directamente a modificaciones más profundas en la secuencia de aminoácidos de la cadena proteica involucrando el sector de reconocimiento de los diferentes anticuerpos monoclonales utilizados.

Conclusiones

- Existe una menor inmunoreactividad en los citosoles de los diferentes helmintos analizados comparada con la observada en DEAE tubulina de mamífero.
- Las diferencias detectadas entre los diversos parásitos puede ser un factor preponderante en la expresión del mecanismo de acción de los benzimidazoles antihelmínticos
- La negatividad a la reacción inmunoquímica obtenida en el estudio de tubulina de *Fasciola hepatica* sería debido a diferencias en la estructura cuaternaria de la proteína del trematode o directamente a modificaciones más profundas en la secuencia de aminoácidos de la cadena proteica involucrando el sector de reconocimiento de los diferentes anticuerpos monoclonales utilizados.
- Estas probables diferencias evolutivas tendrían implicancias directas en el entendimiento de las diferentes susceptibilidades de cada especie a los fármacos benzimidazoles, lo cual puede ser un primer paso hacia la comprensión de la actividad farmacológica de estas drogas, siendo además relevante para optimizar su uso en medicina humana y veterinaria.

Bibliografía

1. Campbell, W. (1990). *Parasitol. Today* 6, 130-133.
2. Coles, G.C. (1986). *J. Helminthol.*, 60,210-212.
3. Dawson, P.J.; Gutteridge, W.E.; Gull, K. (1984). *Biochem. Pharmacol.*, 33:1069-1074.
4. Douch P. and Buchanan L. (1979) *Xenobiotica*, Vol 9, Nº11, 675-679
5. Enos, A.; Coles, G.C. (1990). *Int. J. Parasitol.* 20:2,161-167.
6. Faiweather I. and Boray J.C. (1999). *The Veterinary Journal*, 158, 81-112
7. Fetterer, R. (1986). *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 9, 49-54.
8. Friedman P. and Platzner E. (1978) *Bochim Biophys. Acta* 544, 605-614.
9. Gull K. et al (1987) 619th Meet Cambridge. *Bioch. Soc. Transact.* Vol 15, 59-60.
10. Ireland, C et al (1979) *Biochem Pharmacol.* 28, 2680-2682
11. Ireland, C.; Clayton, L.; Gutteridge, W.; Pogson, C.; Gull, K. (1982). *Mol. Biochem. Parasitol.* 6, 45-53.
12. Köler, p. (2001). *International Journal for Parasitology*. Vol. 31. p. 336-345.
13. Lacey, E. (1990). *Parasitol. Today*, 6, 112-115.
14. Laemmli, U.K. (1970). *Nature*, 227, 680-685.
15. Lanusse, C.; Nare, B.; Prichard, R. (1993). *Xenobiotica*, 23:3 285-95.
16. Lubega, G.; Prichard, R. (1990). *Mol. Biochem. Parasitol.*, 38 221-232.
17. Marriner S. (1980) *Am. J. Vet. Res.* vol 41 Nº 7, 1126-1129.
18. McKellar, Q.; Scott, E. (1990). *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 13, 223-247.
19. Murphy, D.B. (1982). *Methods Cell Biol.*, 24, 31-49.
20. Osborn, M.; Weber, K. (1982). *Methods Cell Biol.* 24, 97-132.
21. Prichard, r. (1994). *Veterinary Parasitology*. V. 54 No. 1-3. p. 259-268.
22. Precious W.Y. and Barrett J. (1989) *Parasitology Today*, Vol. 5, Nº 5, 156-16
23. Solana H.D. et al (1998) *APPTLA.* 48 (4), 199-205
24. Solana H.D., et al (2000) *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 22 (2): 83-88
25. Solana H.D, et al (2001) *Parasitology Res.* 87: 275 – 280.
26. Soulsby, E. (1987). *Parasitología y enfermedades parasitarias.* 7^{ma} Edición, Ed. Interamericana, México D.F., México.
27. Stitt, A.W.; Fairweather, I.; Trudgett, A.G.; Johnston, C.F. (1992). *Parasitol. Res.*, 78:2, 103-107.
28. Tang, L.; Prichard, R. K. (1988)*Mol. Biochem. Parasitol.*, 29:133-140.
29. Teruel M.T. et al (2003) *Vet Human Toxicol.* 45 (3) 131-136.
30. Towbin, H.; Stahelin T.; Gordon, J. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76, 4350-4354.
31. Van den Bossche, H.; Rochette, F.; Hörig, C. (1982). *Adv. Pharmacol. Chemother.*, 19, 67-128.

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria (ISSN nº 1695-7504) es medio oficial de comunicación científico, técnico y profesional de la Comunidad Virtual Veterinaria, se edita en Internet ininterrumpidamente desde 1996. Es una revista científica veterinaria referenciada, arbitrada, online, mensual y con acceso a los artículos íntegros. Publica trabajos científicos, de investigación, de revisión, tesis doctorales, casos clínicos, artículos divulgativos, de opinión, técnicos u otros de cualquier especialidad en el campo de las

Ciencias Veterinarias o relacionadas a nivel internacional.

Se puede acceder vía web a través del portal [Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org) o en **REDVET®** <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> Se dispone de la posibilidad de recibir el Sumario de cada número por [correo electrónico](mailto:redvet@veterinaria.org) solicitándolo a redvet@veterinaria.org

Si deseas postular tu artículo para ser publicado en **REDVET®** contacta con redvet@veterinaria.org después de leer las Normas de Publicación en <http://www.veterinaria.org/normas.html>

Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica siempre que se cite la fuente, enlace con [Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org) y **REDVET®** <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

Veterinaria Organización S.L.® - (Copyright) 1996-2007- E_mail: info@veterinaria.org