



Efecto del Pyrantel-Oxantel en la tenia *Dipylidium caninum*: estudio *in vitro*



Jair Millán-Orozco ^{aH*},

Jersson Millán-Orozco ^{a‡},

Miguel Ángel Betancourt-Alonso ^b,

América Ivette Barrera-Molina ^c,

María Soledad Valledor ^d,

Virginia Méndez ^d,

Alejandra Larrea ^d,

Martín Sebastián Lima ^d,

Javier Morán-Martínez ^e,

Nadia Denys Betancourt-Martínez ^e,

Liliana Aguilar-Marcelino ^f,

^a Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Av. Universidad No. 1001, Col. Chamilpa . 62209, Cuernavaca, Morelos, México.

^b Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia en Pequeñas Especies, Federación Canófila Mexicana A.C. Ciudad de México, México.

^c Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Nutrición. Cuernavaca, Morelos, México.

^d Universidad de la República. Facultad de Veterinaria. Montevideo, Uruguay.

^e Universidad Autónoma de Coahuila. Facultad de Medicina. Torreón, Coahuila, México.

^f Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, Jiutepec, Morelos, México.

[¥] Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Ciencias Médico Veterinarias. Torreón, Coahuila, México.

[‡] Asociación de Médicos Veterinarios Zootecnistas Especialistas en Bovinos de la Comarca Lagunera, A.C. Gómez Palacio, Durango, México.

*Autor de correspondencia: jmillan.orocho@uaaan.edu.mx

Resumen:

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar, *in vitro*, el efecto cestocida de Pirantel-Oxantel en la tenia *Dipylidium caninum*. Cada muestra de intestino se obtuvo mediante una incisión transversal de la zona abdominal de cada sujeto canino sacrificado, se diseccionó individualmente a través de una incisión longitudinal y se examinó para detectar la presencia de *D. caninum*. Se utilizó un microscopio óptico para identificar y verificar la morfología y viabilidad de la proglótide en función de su aspecto macroscópico. Los efectos cestocidas de Pirantel-Oxantel (75 mg de pamoato de pirantel; 75 mg de pamoato de oxantel) se evaluaron en tenias adultas (grupo tratado, n= 21; grupo testigo, n= 21) colocadas en placas de Petri e incubadas a 37 °C. Una hora postincubación, los cestodos *D. caninum* tratados con Pirantel-Oxantel presentaron una disminución del 28 % ($P= 0.001$) en la motilidad, la cual aumentó a una disminución del 52 % ($P=0.0001$) al final de la segunda hora. El grupo testigo ($P= 0.0001$) presentó un 55.7 % de motilidad durante al menos las primeras 6 h de incubación y 4.2 % ($P= 0.001$) de motilidad al final del estudio, mientras que en el grupo tratado se observó un 0 % de motilidad al final del estudio. El Pirantel-Oxantel tuvo un efecto letal ($P= 0.0001$) en el adulto de *D. caninum*, con una mortalidad del 100 % observada 6 h después de la postincubación *in vitro*, mientras que el grupo de control presentó un 55.7 % de viabilidad después del mismo periodo. Además, el Pirantel-Oxantel redujo ($P= 0.001$) el grosor del tegumento en 42.5 % ($10.24 \pm 0.21 \mu\text{m}$), mientras que éste fue de $17.81 \pm 0.33 \mu\text{m}$ para el grupo testigo. Los resultados de este estudio indican que el Pirantel-Oxantel tiene un efecto terapéutico en la presencia de *D. caninum*, induciendo tanto una disminución del grosor del tegumento como un aumento de la mortalidad.

Palabras clave: *Dipylidium caninum*, Helmintos, Zoonosis, Motilidad, Morfología, Efecto cestocida.

Recibido: 11/08/2018

Aceptado: 09/11/2020

Dipylidium caninum (*D. caninum*) es el agente causal de la dipilidiasis, una enfermedad parasitaria causada por el cestodo adulto en perros, gatos, zorros, coyotes y otros carnívoros silvestres⁽¹⁻⁷⁾ y muy conocida como una enfermedad zoonótica que afecta a los humanos^(8,9). El control de los cestodos con potencial riesgo zoonótico para los animales de compañía es de gran importancia para la salud pública a nivel mundial^(2,10,11) dado el estrecho contacto que tanto perros como gatos tienen con los humanos⁽¹²⁾, con un riesgo de infección aún mayor en niños^(8,9). El cestodo adulto *D. caninum* crece hasta una longitud de 50 cm, mientras que su estructura macroscópica tiene la apariencia de cuentas de rosario o una agrupación de semillas de pepino⁽¹³⁾. A diferencia de los nematodos, los parásitos cestodos no tienen un sistema digestivo y crecen a partir de células proliferantes en el cuello, produciendo varios cientos de segmentos conocidos como proglótides y obteniendo alimentos a través del tegumento o pared corporal⁽¹³⁾. Situado en el intestino delgado del hospedero, *D. caninum* absorbe el material digerido y obtiene los nutrientes necesarios para su supervivencia, reproduciéndose sin la dificultad que han sufrido otros parásitos, ya que, como parásito hermafrodita, forma proglótides grávidas llenas de huevos infecciosos por medio de la diferenciación continua^(9,14,15).

El pirantel (E-1,4,5,6-tetrahidro-1-metil-2-pirimidina) es un imidazotiazol antihelmítico derivado de las tetrahidropirimidinas y utilizado ampliamente por veterinarios en especies pequeñas (perros y gatos), dado su amplio espectro de acción contra parásitos gastrointestinales maduros e inmaduros que infectan a animales domésticos⁽¹⁶⁾. El oxantel (1-metil-2-(3-hidroxifenil-etenil) 1,4,5,6-tetrahidropirimidina) es un derivado *m*-oxifenol del pirantel⁽¹⁷⁾ que activa el subtipo N, un subtipo sensible a la nicotina y la metiridina. El pirantel activa el subtipo L, un subtipo sensible al levamisol y al pirantel, lo que explica por qué se han reportado diferencias en sus nematodos objetivo⁽¹⁶⁾.

Las tetrahidropirimidinas comprenden una amplia variedad de sales de pirantel, morantel y oxantel, todas ellas tienen efectos agonistas nicotínicos que alteran el sistema neuromuscular del parásito, afectando la contracción muscular y causando parálisis tónica. Los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) son esenciales para la función nerviosa del parásito, presentando una distribución y fisiología diferente a la encontrada en los mamíferos⁽⁹⁾. Los antihelmíticos agonistas nicotínicos actúan en la acetilcolina nicotínica en la unión neuromuscular del parásito, causando despolarización neuromuscular y parálisis espástica^(18,19). Los nAChR del parásito tienen cinco subunidades de glicoproteínas ubicadas alrededor de un canal iónico central⁽²⁰⁾, que comprende un canal iónico pentamérico operado por ligando, que es una estructura con efectos farmacológicos significativos⁽¹⁶⁾. Además, los

nAChRs son funcionalmente diversos debido a sus extensas familias de genes que codifican subunidades y tres subpoblaciones farmacológicas de receptores⁽¹⁶⁾. La activación del receptor de acetilcolina en nematodos se ha dividido en tres subtipos farmacológicos según el grado de afinidad nicotínica^(21,22), caracterizado y definido de la siguiente manera: el subtipo N, con sensibilidad significativa a la nicotina, metiridina y oxantel; el subtipo L, con afinidad al levamisol y pirantel; y, el subtipo B, con una mayor sensibilidad al befenio.

El mecanismo de acción del pirantel funciona bloqueando la excitación muscular mediante la activación de un agonista del nAChR^(18,19), alterando el sistema neuromuscular y, por lo tanto, provocando contracción muscular y parálisis, lo que resulta en la muerte del parásito⁽⁹⁾. El oxantel (*m*-oxifenol) ha demostrado ser eficaz contra nematodos gastrointestinales de gran impacto tanto en la salud animal como en la salud pública^(23,24). Si bien el efecto de pirantel-oxantel (P-O), como tratamiento combinado, en los parásitos nematodos se ha reportado previamente⁽²⁵⁾, no hay informes científicos sobre los efectos de una combinación de P-O, ya sea *in vivo* o *in vitro*, en la motilidad, el grosor del tegumento u otras estructuras anatómicas en tenias. Por lo tanto, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto cestocida *in vitro* de P-O en la motilidad y el grosor del tegumento de cestodos adultos *Dipylidium caninum* y describir los cambios histológicos en las proglótides grávidas de los organismos.

Todos los procedimientos de eutanasia aplicados en el presente estudio se realizaron siguiendo las pautas recomendadas y aprobadas por el Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y el Código de Ética de la Asociación Médica Mundial (Declaración de Helsinki).

Doscientos sesenta y seis (266) perros callejeros infectados naturalmente fueron muestreados en el Centro de Control Canino y Felino en el municipio de Tláhuac, Ciudad de México, después de ser capturados por la brigada municipal de control de animales. Los animales se sacrificaron por personal autorizado a través de una sobredosis anestésica, obteniéndose después el intestino delgado de cada sujeto mediante una incisión transversal en su abdomen. Los intestinos delgados obtenidos, aún conectados a través de las válvulas gastroduodenal e ileocecal, se almacenaron en bolsas de plástico, etiquetadas con números progresivos y transportadas al Laboratorio de Producción Animal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, ubicada en la ciudad de Cuernavaca⁽²⁶⁾.

Cada muestra de intestino se diseccionó individualmente mediante una incisión longitudinal y se examinó la presencia de cestodos *D. caninum*, que se identificaron a través de la apariencia macroscópica de las proglótides y se distribuyeron utilizando un microscopio óptico para verificar su morfología⁽²⁷⁾. La observación directa se llevó a cabo bajo un microscopio para determinar la viabilidad de los parásitos en el objetivo de 40X, con cestodos

que presentaron motilidad completa durante un periodo de un minuto considerado viable para la posterior experimentación⁽²⁸⁻³⁰⁾.

Se evaluó el efecto cestocida de P-O en parásitos adultos (grupo tratado (P-O), n= 21; grupo testigo (GT), n= 21), con los individuos colocados en placas de Petri de 90x60 mm que contenían 10 ml de RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 e incubados a 37 °C durante 10 h. Se utilizó agua destilada y el PMSF (fluoruro de fenilmetanosulfonilo) como vehículo inhibidor de la proteasa para el grupo de control, con el fin de mantener la anatomía estructural y la fisiología de los cestodos. Para el grupo tratado, se utilizó un medicamento desparasitante comercial (75 mg de Pamoato de Pirantel y 75 mg de Pamoato de Oxantel (Vermiplex), Laboratorios Holland Animal Health, Jiutepec, Morelos, México), en el que se agregaron tabletas maceradas al agua destilada en las placas de Petri.

Después de la incubación, se realizó una observación directa en un microscopio estereoscópico cada hora para determinar los efectos cestocidas. La prueba de motilidad se realizó por triplicado⁽²⁶⁾, en la que la motilidad del cestodo se evaluó en una escala de 0 a 5, de la siguiente manera: 0 indicó tenias completamente inmóviles que no respondieron a la estimulación manual; 1 indicó movimiento solo cuando se pincharon; 2 indicó actividad espontánea, pero únicamente en cada extremo del organismo, a saber, el escólex y el extremo del estróbilo; 3 indicó actividad lenta y espontánea durante toda la evaluación; 4 indicó que el sujeto estaba más activo; y, 5 indicó que el sujeto estaba altamente activo⁽²⁸⁻³⁰⁾.

Se obtuvieron segmentos de parásitos adultos (proglótides grávidas) y se fijaron en paraformaldehído al 10 % y se mantuvieron bajo refrigeración a 4 °C hasta que se realizó el procedimiento histológico. Con el fin de observar la estructura histológica y cuantificar la altura del epitelio secretor y el grosor de la lámina propia, se obtuvieron secciones de tejido y se colocaron sobre portaobjetos de vidrio previamente tratados con poli-l-lisina. La parafina se eliminó de las secciones con xilol, se hidrató con alcoholes de diferentes concentraciones y se hizo permeable con tritón X-100 al 0.1 % en citrato de sodio durante 20 min, mientras que la actividad de la peroxidasa endógena se inhibió incubando el tejido durante 25 min en una solución de H₂O₂ al 0.3 % a temperatura ambiente. Las preparaciones se lavaron con una solución tampón de fosfato (PBS1X) y se marcaron con un lápiz hidrofóbico alrededor del tejido⁽³¹⁻³³⁾. Se procesaron segmentos de cestodo *D. caninum*, obteniendo secciones semiseriales de 5 µm. Se utilizó tinción de hematoxilina y eosina para evaluar la estructura histológica y el grosor del tegumento⁽²⁷⁾. Para cada sección histológica, se observaron seis campos de microscopio utilizando un objetivo de 40X, mientras que se realizaron seis mediciones de grosor del tegumento utilizando el analizador de imágenes Motic 2.0 y luego se fotografiaron^(26,27).

Los datos experimentales correspondientes a las observaciones de motilidad *in vitro* se analizaron mediante una prueba Z, mientras que las mediciones del grosor del tegumento se

compararon mediante una prueba t de Student⁽³⁴⁾. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $P < 0.05$, los resultados de motilidad *in vitro* se expresan como porcentaje y los resultados histológicos se expresan como media y error estándar.

Los resultados de la eficacia de P-O en términos de la motilidad de los parásitos *D. caninum* están disponibles en el Cuadro 1. Al inicio del experimento (hora 0) del experimento, ambos grupos presentaron movimiento total ($P=0.07$). El P-O mostró una reducción progresiva de la motilidad (del 72.0 al 4.8 %) desde la primera hasta la quinta hora después de la incubación, logrando así una reducción media por hora del 19 %, mientras que, de las horas seis a diez, se observó un 0 % de motilidad. En el grupo de control (GT), se observó un 100 % de motilidad durante las primeras 2 h postincubación, mientras que la motilidad se redujo del 96.2 al 4.2 % desde la tercera hora hasta el final del experimento, dando una reducción media del 10 % por hora.

Cuadro 1: Motilidad *in vitro* (%) de los cestodos adultos *Dipylidium caninum* tratados con Pirantel-Oxantel

Grupos	Incubación (h)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Pirantel-Oxantel	100 ^a	72.0 ^a	48.0 ^a	25.0 ^a	15.8 ^a	4.8 ^a	0.0 ^a				
Testigo	100 ^a	100 ^b	100 ^b	96.2 ^b	85.3 ^b	72.7 ^b	55.7 ^b	41.5 ^b	31.5 ^b	20.0 ^b	4.2 ^b

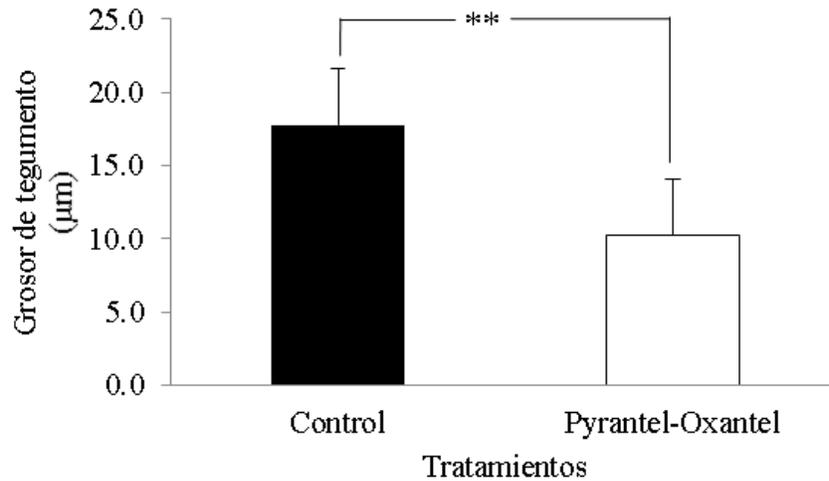
Se realizaron tres réplicas para cada grupo, utilizando 126 tenias.

^{ab} Letras diferentes muestran diferencias significativas ($P=0.0001$).

Se observó una diferencia ($P=0.0001$) entre el grupo tratado y el GT entre la primera hora y el final del experimento. En la primera hora postincubación, la motilidad del grupo tratado fue del 72.0 %, mientras que esta fue del 100 % para el GT ($P=0.0001$). Se observó motilidad de 55.7, 41.5, 31.5, 20.0 y 4.2 % en las horas 6, 7, 8, 9 y 10 postincubación, mientras que se observó un 0.0 % de motilidad en el grupo tratado a partir de la sexta hora en adelante postincubación ($P=0.0001$).

Los efectos de P-O en el grosor del tegumento ($P=0.001$) de los cestodos adultos *D. caninum* se muestran en las Figuras 1 y 2, en el que el P-O disminuyó el grosor del tegumento en un 42.5 % ($10.24 \pm 0.21 \mu\text{m}$) (Figura 2b; punta de flecha gris), mientras que éste fue de $17.81 \pm 0.33 \mu\text{m}$ para el GT (Figura 2a; punta de flecha gris).

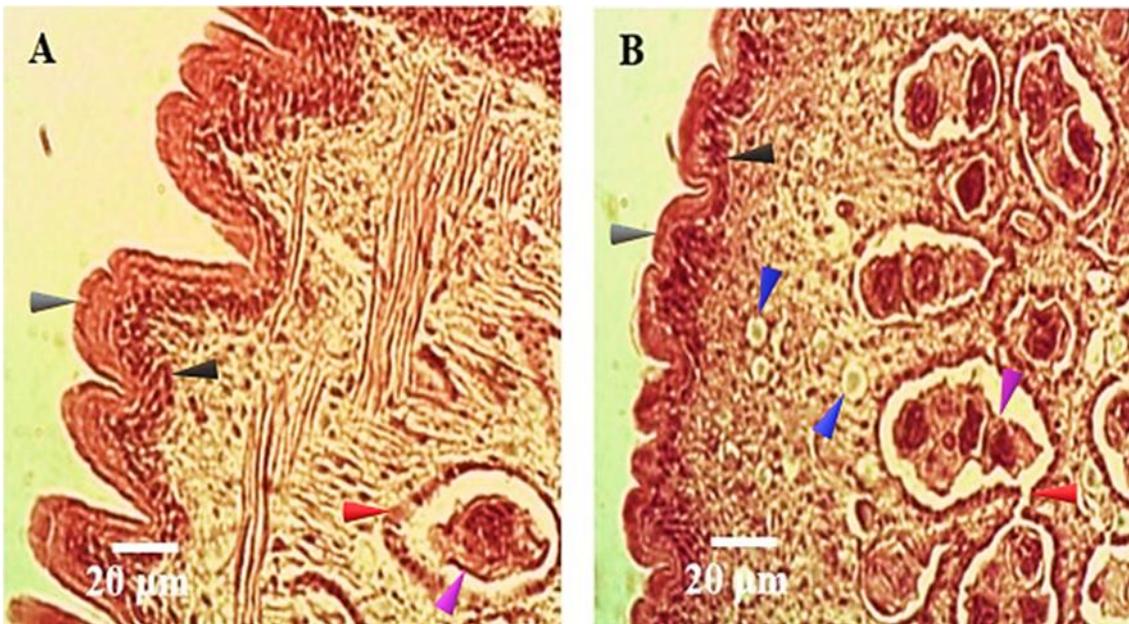
Figura 1: Efecto de Pirantel-Oxantel en el grosor del tegumento (media \pm ESM) en cestodos adultos *Dipylidium caninum*



**Diferencias significativas entre grupos ($P=0.001$).

Los efectos de P-O en la estructura general de *D. caninum*, en comparación con la estructura presentada por el GT, se muestran en las Figuras 2a y b. Un hallazgo significativo con respecto a la histología de las proglótides grávidas observadas fue la concentración de corpúsculos calcáreos (CC) inmaduros (puntas de flecha negras) a lo largo de la superficie y cerca del tegumento (Figura 2a, b). En el GT, la concentración de CC inmadura fue mayor que la observada en las proglótides tratadas con P-O (Figura 2a; punta de flecha negra), mientras que los CC maduros solo se observaron en el grupo P-O (Figura 2b; punta de flecha azul), en el que también se observó una alteración de los huevos de *D. caninum*. En el grupo tratado con P-O, se encontró que la morfología y distribución de los sacos de los huevos había sido alterada, mientras que, en el GT, los sacos de los huevos presentaron una morfología y distribución normal (Figura 2b; punta de flecha morada). Finalmente, el embrióforo, la capa vitelina y el embrión permanecieron casi completamente intactos en el GT, mientras que, en el grupo P-O, tales estructuras se distendieron (Figura 2a; punta de flecha roja).

Figura 2: Secciones histológicas de tenias *Dipylidium caninum*. Espesor del tegumento obtenido en cestodos no tratados (A) y tratados con Pirantel-Oxantel (B)



A) Grosor del tegumento intacto (punta de flecha gris), corpúsculos calcáreos inmaduros a lo largo de la superficie y cerca del tegumento (puntas de flecha negras), embrióforo y capa vitelina intactos (punta de flecha púrpura) y el embrión (puntas de flecha rojas). **B)** Reducción del grosor del tegumento (punta de flecha gris), reducción del número de corpúsculos calcáreos inmaduros (punta de flecha negra), apariencia de corpúsculos calcáreos maduros (punta de flecha azul), morfología y distribución de sacos de huevos (punta de flecha morada), embrióforo, capa vitelina, embrión y estructuras distendidas (puntas de flecha moradas y rojas).

El presente estudio muestra los efectos de P-O en la motilidad y el grosor del tegumento de los cestodos adultos *D. caninum*, así como otras estructuras histológicas como corpúsculos calcáreos, sacos de huevos, embrióforo, la capa vitelina y el embrión. Los resultados de motilidad obtenidos en el presente estudio muestran que el P-O tiene un efecto directo en la motilidad, causando 100 % de inhibición de la motilidad 6 h postincubación. Algunos fármacos tienen un efecto rápido en la transmisión neuromuscular de algunos parásitos, con, por ejemplo, pirantel y oxantel que actúan como agonistas en los nAChRs sinápticos y extrasinápticos en las células musculares del nematodo, produciendo contracción y parálisis espástica⁽³⁵⁾. Estudios anteriores evaluaron los efectos del pamoato de pirantel contra *Caenorhabditis elegans*⁽³⁶⁾, mientras que el pamoato pirantel y el pamoato oxantel, utilizados en combinación, han demostrado ser eficaces contra *Trichuris muris*⁽³⁷⁾ *Ascaris lumbricoides*⁽³⁸⁾, aunque se ha encontrado que este tratamiento es ineficaz contra *Ancylostoma ceylanicum* y *Necator americanus*⁽³⁷⁾. Los efectos del pamoato de pirantel y el pamoato de oxantel, 24 h después de la exposición, incluyen contracción muscular, inhibición de la motilidad y una reducción en el tamaño del parásito^(36,37), tanto en larvas infecciosas como en organismos adultos. Mientras los efectos encontrados en estos estudios concuerdan

con los hallazgos del presente estudio, el tratamiento P-O aplicado causó una mortalidad del 100 % en tenias *D. caninum* a partir de la sexta hora en adelante postexposición.

Los efectos del pamoato de pirantel (en forma de pasta) se evaluaron en la tenia común del caballo *A. perfoliata*⁽³⁹⁻⁴¹⁾, con una reducción del 92 a 98 % en la motilidad obtenida en tenias adultas después de 7 a 16 días de tratamiento en caballos infectados naturalmente examinados en la necropsia⁽⁴⁰⁾. Dichos resultados concuerdan con el 100 % de mortalidad observada *in vitro* en el presente estudio 6 h después de la incubación. Como la sal de pamoato de pirantel es prácticamente insoluble en agua, se absorbe a un ritmo reducido en el tracto gastrointestinal, lo que le permite llegar a los sitios microambientales en los parásitos objetivo más fácilmente que otras sales de pirantel como el tartrato, que es más soluble en agua y se absorbe más rápidamente a través del tracto gastrointestinal, para luego ser metabolizada y excretada tanto en la orina como, en pequeñas cantidades, en heces⁽⁴⁰⁾. Por lo tanto, el presente estudio muestra, *in vivo*, la ventaja del tratamiento P-O aplicado en el presente estudio en perros infectados naturalmente con tenias *D. caninum*, ya que, al menos, se observó un efecto letal *in vitro*.

Se ha encontrado que la combinación de pirantel con otros fármacos tiene un potencial antihelmíntico limitado, como se observó en *A. ceylanicum* y *N. americanus*⁽³⁷⁾ *in vitro*, los cuales presentaron efectos antagónicos y no letales. Sin embargo, el presente estudio encontró un efecto sinérgico y un aumento de la potencia a través de la combinación de pamoato pirantel y pamoato oxantel, obteniendo una mortalidad del 100 % en el cestodo adulto *D. caninum*. Un efecto similar se observó en un estudio anterior que utilizó una combinación de pirantel embonato, oxantel embonato y praziquantel, obteniendo una mortalidad *in vitro* del 100 % ocho horas postincubación⁽³³⁾. Si bien los resultados anteriores concuerdan con los obtenidos por el presente estudio, muestran una mortalidad *in vitro* del 100 % 6 h postincubación. El efecto de P-O observado en el presente estudio se debe a la capacidad del fármaco para permanecer en micrositos en los parásitos, aumentando así su absorción por el cestodo a lo largo de la longitud del tegumento, y acortando el tiempo en el que surte efecto, aumentando así la mortalidad.

El tegumento es una de las principales estructuras de un cestodo, el cual requiere esta característica anatómica tanto para absorber material semidigerido del intestino delgado del hospedero, como para mejorar la función fisiológica y la reproducción del cestodo, dado que, a diferencia de los nematodos, los cestodos no tienen tracto digestivo. Por lo tanto, la capacidad de absorción del tegumento en cestodos es mayor que la encontrada en nematodos. En relación con lo anterior, durante su establecimiento, los parásitos helmintos producen mayores niveles de citoquinas proinflamatorias en el hospedero⁽⁴²⁾, produciendo, en consecuencia, caquexia.

El P-O redujo sustancialmente el grosor del tegumento en la tenia *D. caninum*. Existen informes en la literatura de que este tratamiento afecta al tegumento en diferentes grados, causando cambios y daños morfológicos irreversibles en el tegumento y parénquima, alteraciones en la organización muscular, ausencia de microvellosidades tegumentarias, pérdida de células de la membrana en el tejido subtegumental, el desarrollo de un tegumento granular denso, y grandes vacuolas que generan un aspecto irregular y poroso, en los siguientes organismos: las tenias de roedores *Hymenolepis nana*^(43,44), *Hymenolepis microstoma*⁽⁴⁴⁾, *Taenia taeniformis*^(44,45), *Echinococcus multilocularis*^(44,45) e *Hymenolepis diminuta*^(29,44,45); *Taenia solium* en hámsteres infectados experimentalmente⁽⁴⁶⁾; *Taenia crassiceps*⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾; *Mesocestoides corti*⁽⁵⁰⁾; *Raillietina echinobothrida*⁽⁵¹⁻⁵⁴⁾ en aves domésticas; *Anoplocephala perfoliata*⁽³⁰⁾ en caballos; *D. caninum*⁽³³⁾ en perros, gatos y humanos; el trematodo *Fasciola hepatica* en ratas⁽⁵⁵⁾; *Artyfechinostomum sufrartyfex*⁽⁵⁶⁾ en humanos; *Fasciolopsis buski*^(53,56); el nematodo gastrointestinal porcino *Ascaris suum*⁽⁵³⁾; el nematodo anquilostoma gastrointestinal canino *Ancylostoma ceylanicum*⁽⁵⁷⁾; los nematodos gastrointestinales de roedores *Rodentolepis microstoma*⁽⁵⁷⁾, *Trichuris muris*⁽⁵⁸⁾ y *Heligmosomoides polygyrus*⁽⁵⁹⁾; y los nematodos parásitos de plantas de los géneros *Meloidogyne* y *Globodera*⁽⁶⁰⁾. Los resultados del presente estudio concuerdan con los resultados mencionados, como la reducción (adelgazamiento) del tegumento en 42.5 % en los parásitos de *D. caninum* tratados con P-O después de 6 h de incubación *in vitro*. El efecto de este tratamiento en el grosor del tegumento puede ser más pronunciado en parásitos incubados durante más de 6 h, como lo demuestran nuestros resultados histológicos; sin embargo, no se obtuvieron resultados histológicos de los sujetos tratados más de 6 h postincubación.

El presente estudio mostró la presencia de CC en segmentos grávidos tanto en el GT como en el grupo P-O; sin embargo, en el grupo P-O, el número de CC fue menor. La biomineralización es un fenómeno generalizado en los invertebrados, con el carbonato de calcio, uno de los biominerales más abundantes implicados en dicho proceso⁽⁶¹⁾. En los cestodos, los minerales producen CC, función que ha sido objeto de especulación científica, con algunas hipótesis propuestas, una de las cuales postula que los CC representan aproximadamente el 10 % del peso corporal de los parásitos y que se encuentran comúnmente en el parénquima de muchos metacestodos y cestodos adultos^(61,62). Otra hipótesis es que los CC juegan un papel importante en la desintoxicación⁽⁶³⁾, ya que, debido a que se producen principalmente en ausencia de oxígeno, se cree que amortiguan anaeróticamente los ácidos y sirven como reservorio para iones inorgánicos⁽⁶⁴⁾. Cabe señalar que los CC son, en parte, un producto excretor que sirve para eliminar los desechos metabólicos del cuerpo al pasar a través del tegumento⁽⁶²⁾. Los corpúsculos calcáreos están compuestos por una base orgánica acoplada a sustancias inorgánicas, como potasio, sodio, magnesio, silicato, calcio, fosfato⁽⁶¹⁾ y sulfato en diferentes larvas de cisticercos y cestodos adultos⁽⁶⁴⁾. Su base orgánica incluye ADN, ARN⁽⁶⁵⁾, proteínas^(66,67) y glucógeno^(46,68). Por lo tanto, en el presente estudio, la disminución del número de CC inmaduros distribuidos cerca del tegumento en el grupo P-O

se debió tanto a un alto nivel de absorción a través del tegumento de los cestodos *D. caninum* como a la duración de la incubación *in vitro*. Además, el 100 % de mortalidad obtenido por el presente estudio también se debe tanto a una pérdida de la proteína y el glucógeno requeridos por el proceso metabólico en las células, como a una probable desintegración del ADN del organismo.

Como se han realizado pocos estudios sobre la densidad y ubicación de los CC en diferentes partes del estróbilo de cestodos *D. caninum*, Khalifa *et al*⁽²⁷⁾ realizaron un estudio histoquímico y ultraestructural comparativo para determinar las diferencias en la ubicación, distribución, composición y funciones de los CC de *D. caninum* y *T. taeniaeformis*. Los resultados del presente estudio en relación con los CC concuerdan con los obtenidos por Khalifa *et al*⁽²⁷⁾, ya que la distribución de los CC se concentró en los lados laterales de los segmentos grávidos del cestodo *D. caninum* y se vieron afectados por el tratamiento P-O.

La tinción de hematoxilina y eosina de los segmentos grávidos mostró que, en el GT, los huevos de *D. caninum* se agruparon en sacos como en lo observado por Khalifa *et al*⁽²⁷⁾, mientras que el grupo P-O presentó signos de alteraciones morfológicas, como distensión de los huevos, embrióforo, embrión y capa vitelina. Si bien pocos estudios han observado la estructura de los segmentos grávidos de *D. caninum*, Peña *et al*⁽³³⁾ observaron los efectos de la toxina *B. thuringiensis* en *D. caninum*, resultados que concuerdan con los del presente estudio al mostrar efectos en la motilidad, el grosor del tegumento y los huevos; efectos que reducen el porcentaje de motilidad, adelgazan el tegumento y dañan los huevos del organismo. Sin embargo, Peña *et al*⁽³³⁾ utilizaron un fármaco comercial que contenía embonato de pirantel, embonato de oxantel y praziquantel como control positivo.

Se han utilizado otras estrategias para disminuir la infectividad de los huevos de *D. caninum*, con un estudio realizado en Brasil por Araujo *et al*⁽⁶⁹⁾ que evalúa el efecto de los hongos nematófagos *Poconia chlamydospora*, *Duddingtonia flagrans* y *Monacrosporium thaumasium* en las cápsulas de los huevos. Sus resultados mostraron que los aislados de *Poconia chlamydospora* (tipos 2 y 3) tuvieron una actividad ovicida entre 5 y 15 d después de la incubación *in vitro*. Sin embargo, hasta la fecha, se ha encontrado que la actividad de un fármaco sintetizado tiene efectos más rápidos y pronunciados, como se observa con el tratamiento P-O utilizado en el presente estudio.

Con base en los resultados del presente estudio, el P-O tiene efectos cestocidas *in vitro* contra la tenia *D. caninum*, mostrando un efecto letal y disminuyendo la motilidad en un 100 % dentro de las primeras 6 h después de la incubación *in vitro*. Además, el P-O tiene un efecto directo en el grosor del tegumento, reduciéndolo en un 42 %. El presente estudio es el primero realizado sobre los efectos *in vitro* de P-O en la mortalidad, la reducción del grosor del tegumento y las alteraciones en las estructuras histológicas, como los huevos, el embrióforo, el embrión y la capa vitelina de la tenia *D. caninum*. El uso de una combinación de P-O es

un tratamiento farmacológico opcional para el control de *D. caninum* en perros y gatos infectados naturalmente.

Agradecimientos

Al Centro de control canino y felino, Tláhuac, Ciudad de México, por su ayuda en la recolección de muestras de intestino delgado de perros infectados naturalmente; a Maribel Nieto Miranda de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM), por su gran ayuda con los procedimientos histológicos; a la SEP-PROMEP por el apoyo financiero brindado a Jair Millán-Orozco (Cuota escolar: 422006-0708) para la realización de su Maestría en Ciencias en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (FCA-UAEM); y, finalmente, a Adriana Silva de Oliveira por su asistencia técnica.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Literatura citada:

1. Dalimi A, Sattari A, Motamedi GH. A study on intestinal helminthes of dogs, foxes and jackals in the western part of Iran. *Vet Parasitol* 2006;142(1-2):129-133.
2. Hernández MR, Núñez FA, Pelayo DL. Potencial zoonótico de las infecciones por helmintos intestinales en perros callejeros de Ciudad de La Habana. *Rev Cub Med Trop* 2007;59(3):234-240.
3. Ziadinov I, Deplazes P, Mathis A, Mutunova B, Abdykerimov K, Nurgaziev R, Torgerson PR. Frequency distribution of *Echinococcus multilocularis* and other helminths of foxes in Kyrgyzstan. *Vet Parasitol* 2010;171(3-4):286-292.
4. Xhaxhiu D, Kusi I, Rapti D, Kondi E, Postoli R, Rinaldi L, *et al.* Principal intestinal parasites of dogs in Tirana, Albania. *Parasitol Res* 2011;108(2):341-353.
5. Cantó GJ, Guerrero RI, Olvera-Ramírez AM, Milián F, Mosqueda J, Aguilar-Tipacamú G. Prevalence of fleas and gastrointestinal parasites in free-roaming cats in Central Mexico. *Plos One* 2013;8(4):1-6.

6. Adolph C, Barnett S, Beall M, Drake J, Elsemore D, Thomas J, Little S. Diagnostic strategies to reveal covert infections with intestinal helminths in dogs. *Vet Parasitol* 2017;247:108-112. [dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.10.002](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.10.002).
7. Figueiredo PP, da Silva BA, Pereira de Moura AP, Leitão VM, Antunes UCA, Pereira BOM, Reis AMR. Gastrointestinal parasites in stray and shelter cats in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Vet Parasitol* 2017;26(3):383-388.
8. Molina CP, Ogburn J, Adegboyega P. Infection by *Dipylidium caninum* in an infant. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127(3):157-159.
9. Bowman DD. *Georgis' Parasitología para Veterinarios*. 8^a ed. Madrid, España: Elsevier; 2004.
10. Charles SD, Altreuther G, Reinemeyer CR, Buch J, Settje T, Cruthers L, *et al*. Evaluation of the efficacy of emodepside+praziquantel topical solution against cestode (*Dipylidium caninum*, *Taenia taeniaeformis*, and *Echinococcus multilocularis*) infection in cats. *Parasitol Res* 2005;97(1):33-40.
11. Rodríguez-Vivas RI, Gutiérrez-Ruiz E, Bolio-González ME, Ruiz-Piña H, Ortega-Pacheco A, Reyes-Novelo E, *et al*. An Epidemiological study of intestinal parasites of dogs from Yucatan, Mexico, and their risk to public health. *Vector-Borne Zoon Dis* 2011;11(8):1141-1144.
12. Eguía-Aguilar P, Cruz-Reyes A, Martínez-Maya JJ. Ecological analysis and description of the intestinal helminths present in dogs in Mexico City. *Vet Parasitol* 2005;127(2):139-146.
13. Hendrix CM. *Diagnostic veterinary parasitology*. 2nd ed. St. Louis, MO, USA: Mosby; 1998.
14. Merchant MT, Aguilar L, Avila G, Robert L, Flisser A, Willms K. *Taenia solium*: description of the intestinal implantation sites in experimental hamster infections. *J Parasitol* 1998;84(4):681-685.
15. Domínguez MF, Koziol U, Porro V, Costábile A, Estrade S, Tort J, Bollati-Fologin F, Castillo E. A new approach for the characterization of proliferative cells in cestodes. *Exp Parasitol* 2014;138:25-29. [dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2014.01.005](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.01.005).
16. Martin RJ, Clark CL, Trailovic SM, Robertson AP. Oxantel is an N-type (methyridine and nicotine) agonist not an L-type (levamisole and pyrantel) agonist: classification of cholinergic anthelmintics in *Ascaris*. *Int J Parasitol* 2004;34(9):1083-1090.
17. McFarland JW, Howes HL. Novel anthelmintic agents. 6. Pyrantel analogues with activity against whipworm. *J Med Chem* 1972;15(4):365-368.

18. Robertson SJ, Pennington AJ, Evans AM, Martin RJ. The action of pyrantel as an agonist and an open channel blocker at acetylcholine receptors in isolated *Ascaris suum* muscle vesicles. *Eur J Pharmacol* 1994;271(2-3):273-282.
19. Kopp SR, Kotze AC, McCarthy JS, Traub RJ, Coleman GT. Pyrantel in small animal medicine: 30 years on. *Vet J* 2008;178(2):177-184.
20. Conti-Tronconi BM, McLane KE, Raftery MA, Grando SA, Protti MA. The nicotinic acetylcholine receptor: Structure and autoimmune pathology. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1994;29(2):69-123.
21. Robertson AP, Clark CL, Burns TA, Thompson DP, Geary TG, Trailovic SM, Martin RJ. Paraherquamide and 2-deoxyparaherquamide distinguish cholinergic receptor subtypes in *Ascaris* muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302(3):853-860.
22. Martin RJ, Bai G, Clark CL, Robertson AP. Methyridine (2- [2-methoxyethyl]-pyridine) and levamisole activate different Ach receptor subtypes in nematode parasites: a new lead for levamisole resistance. *Brit J Pharm* 2003;140(6):1068-1076.
23. Howes Jr HL. Trans-1,4,5,6-tetrahydro-2-(3-hydroxystyryl)-1-methyl pyrimidine (CP-14,445), a new antiwhipworm agent. *Proc Soc Exp Biol Med* 1972;139:394-398.
24. Robinson M, Hooke F, Iverson KE. Efficacy of oxantel pamoate and pyrantel pamoate in combination against *Trichuris vulpis*, *Ancylostoma caninum* and *Toxocara canis* in dogs. *Aust Vet Pract* 1976;6:173-176.
25. Albonico M, Bickle Q, Haji HJ, Ramsan M, Khatib KJ, Montresor A, Savioli L, Taylor M. Evaluation of the efficacy of pyrantel-oxantel for the treatment of soil-transmitted nematode infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002;96(6):685-690.
26. Millán OJ. Evaluación in vitro de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* contra el cestodo adulto de perros *Dipylidium caninum* [tesis maestría] Cuernavaca, Morelos, México: Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos; 2009.
27. Khalifa RMA, Mazen NAM, Marawan AMA, Thabit HTM. Histochemical and ultrastructural studies on the calcareous corpuscles and eggs of *Taenia teaniformis* and *Dipylidium caninum*. *J Egypt Soc Parasitol* 2011;41(2):513-528.
28. Stepek G, Buttle DJ, Duce IR, Lowe A, Behnke JM. Assessment of the anthelmintic effect of natural plant cysteine proteinases against the gastrointestinal nematode, *Heligmosomoides polygyrus*, in vitro. *Parasitology* 2005;130(2):203-211.

29. Mansur F, Luoga W, Buttle DJ, Duce IR, Lowe A, Behnke JM. The anthelmintic efficacy of natural plant cysteine proteinases against two rodent cestodes *Hymenolepis diminuta* and *Hymenolepis microstoma* *in vitro*. *Vet Parasitol* 2014;201(1-2):48-58.
30. Mansur F, Luoga W, Buttle DJ, Duce IR, Lowe AE, Behnke JM. The anthelmintic efficacy of natural plant cysteine proteinases against the equine tapeworm, *Anoplocephala perfoliata* *in vitro*. *J Helminthol* 2016;90(5):561-568.
31. Flores-Pérez FI, de Aluja AS, Martínez-Maya JJ. Efectos en el desarrollo del metacestodo de *Taenia solium* inducidos por dosis bajas de radiación gamma. *Vet Méx* 2006;37(3):303-311.
32. Rosas-Velasco C, Pérez-Martínez M, Castillo-Juárez H, Flores-Pérez FI. Cambios histológicos inducidos por el acetato de medroxiprogesterona en el útero de conejas ovariectomizadas. *Vet Méx* 2007;38(2):207-214.
33. Peña G, Aguilar Jiménez FA, Hallal-Calleros C, Morales-Montor J, Hernández-Velázquez VM, Flores-Pérez FI. *In vitro* ovicidal and cestocidal effects of toxins from *Bacillus thuringiensis* on the canine and human parasite *Dipylidium caninum*. *BioMed Res Int* 2013. [dx.doi.org/10.1155/2013/174619](https://doi.org/10.1155/2013/174619).
34. Wayne WD. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ª ed. México, D.F: Limusa; 2006.
35. Martin RJ. Modes of action of anthelmintic drugs. *Vet J* 1997;154(1):11-34.
36. Hu Y, Xiao SH, Aroian RV. The new anthelmintic tribendimidine is an L-type (levamisole and pyrantel) nicotinic acetylcholine receptor agonist. *Plos Neglected Trop Dis* 2009;3(8):1-9.
37. Keiser J, Tritten L, Silbereisen A, Speich B, Adelfio R, Vargas M. Activity of oxantel pamoate monotherapy and combination chemotherapy against *Trichuris muris* and hookworms: Revival of an old drug. *Plos Neglected Trop Dis* 2013;7(3):1-8.
38. Choi WY, Lee OR, Lee WK, Kim WK, Chung CS, Ough BO. A clinical trial of Oxantel and Pyrantel against intestinal nematodes infections. *Korean J Parasitol* 1979;17(1):60-66.
39. Slocombe JOD. A modified critical test for the efficacy of pyrantel pamoate for *Anoplocephala perfoliata* in equids. *Can J Vet Res* 2004;68(2):112-117.
40. Marchiondo AA, White GW, Smith LL, Creinemeyer CR, Dascanio JJ, Johnson EG, Shugart JI. Clinical field efficacy and safety of pyrantel pamoate paste (19.13% w/w pyrantel base) against *Anoplocephala perfoliata* in naturally infected horses. *Vet Parasitol* 2006;137(1-2):94-102.

41. Reinemeyer CR, Hutchens DE, Eckblad WP, Marchiondo AA, Shugart JI. Dose-confirmation studies of the cestocidal activity of pyrantel pamoate paste in horses. *Vet Parasitol* 2006;138(3-4):234-239.
42. Reyes JL, González MI, Ledesma-Soto Y, Satoskar AR, Terrazas LI. TLR2 mediates immunity to experimental cysticercosis. *Int J Biol Sci* 2011;7(9):1323-1333.
43. Becker B, Mehlhorn H, Andrews P, Thomas H. Scanning and transmission electron microscope studies on the efficacy of praziquantel on *Hymenolepis nana* (Cestoda) *in vitro*. *Z Parasitenkd* 1980;61(2):121-133.
44. Mehlhorn H, Becker B, Andrews P, Thomas H. On the nature of the proglottids of cestodes: A light and electron microscopic study on *Taenia*, *Hymenolepis*, and *Echinococcus*. *Z Parasitenkd* 1981;65(3):243-259.
45. Becker B, Mehlhorn H, Andrews P, Thomas H. Ultrastructural investigations on the effect of praziquantel on the tegument of five species of Cestodes. *Z Parasitenkd* 1981;64(3):257-269.
46. Willms K, Robert L, Caro JA. Ultrastructure of smooth muscle, gap junctions and glycogen distribution in *Taenia solium* tapeworms from experimentally infected hamsters. *Parasitol Res* 2003;89(4):308-316.
47. Willms K, Robert L, Jiménez JA, Everhart M, Kuhn RE. Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon in *Taenia crassiceps* strobilae WFU strain (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae) from golden hamsters. *Parasitol Res* 2004;93:262-267. [dx.doi.org/10.1007/s00436-004-1125-5](https://doi.org/10.1007/s00436-004-1125-5).
48. Willms K, Robert L. Ultrastructure of a spermatid transport system in the mature proglottids of experimental *Taenia crassiceps* (WFU strain). *Parasitol Res* 2007;101:967-973. [dx.doi.org/10.1007/s00436-007-0570-3](https://doi.org/10.1007/s00436-007-0570-3).
49. Willms K, Zurabian R. *Taenia crassiceps*: *in vivo* and *in vitro* models. *Parasitology* 2010;137(3):335-346.
50. Maggiore M, Elissondo MC. *In vitro* cestocidal activity of thymol on *Mesocestoides corti* Tetrathyridia and adult worms. *Interdisciplinary Perspectives on Infect Dis* 2014. [dx.doi.org/10.1155/2014/268135](https://doi.org/10.1155/2014/268135).
51. Tandon V, Pal P, Roy B, Rao HSP, Reddy KS. *In vitro* anthelmintic activity of root-tuber extract of *Flemingia vestita*, an indigenous plant in Shillong, India. *Parasitol Res* 1997;83(5):492-498.

52. Roy B, Dasgupta S, Tandon V. Ultrastructural observations on tegumental surface of *Raillietina echinobothrida* and its alterations caused by root-peel extract of *Millettia pachycarpa*. *Microscopy Res Tech* 2008;71(1):810-815.
53. Challam M, Roy B, Tandon V. Effect of *Lysimachia ramosa* (Primulaceae) on helminth parasites: Motility, mortality and scanning electron microscopic observations on surface topography. *Vet Parasitol* 2010;169(1-2):214-218.
54. Dasgupta S, Roy B, Tandon V. Ultrastructural alterations of the tegument of *Raillietina echinobothrida* with the stem bark of *Acacia oxyphylla* (Leguminosae). *J Ethnopharmacol* 2010;127(2):568-571.
55. Meaney M, Fairweather I, Brennan GP, Forbes AB. 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* 2004;92:232-241. [dx.oai.org/10.1007/s00436-003-1036-x](https://doi.org/10.1007/s00436-003-1036-x).
56. Roy B, Tandon V. Effect of root-tuber extract of *Flemingia vestita*, a leguminous plant, on *Artyfechinostomum sufrartyfex* and *Fasciolopsis buski*: A scanning electron microscopy study. *Parasitol Res* 1996;82:248-252. [dx.doi.org/10.1007/s004360050104](https://doi.org/10.1007/s004360050104).
57. Stepek G, Lowe AE, Buttle DJ, Duce IR, Behnke JM. *In vitro* anthelmintic effects of cysteine proteinases from plants against intestinal helminths of rodents. *J Helminthol* 2007;81(4):353-360.
58. Stepek G, Lowe AE, Buttle DJ, Duce IR, Behnke JM. *In vitro* and *in vivo* anthelmintic efficacy of plant cysteine proteinases against the rodent gastrointestinal nematode, *Trichuris muris*. *Parasitology* 2006;132(5):681-689.
59. Stepek G, Lowe AE, Buttle DJ, Duce IR, Behnke JM. The anthelmintic efficacy of plant-derived cysteine proteinases against the rodent gastrointestinal nematode, *Heligmosomoides polygyrus*, *in vivo*. *Parasitology* 2007;134(10):1409-1419.
60. Stepek G, Curtis RHC, Kerry BR, Shewry PR, Clark SJ, Lowe AE, Duce IR, Buttel DJ, Behnke JM. Nematicidal effects of cysteine proteinases against sedentary plant parasitic nematodes. *Parasitology* 2007;134(12):1831-1838.
61. Chalar C, Salomé M, Señolare-Pose M, Marín M, Williams CT, Dauphin Y. A high resolution analysis of the structure and chemical composition of the calcareous corpuscles from *Mesocestoides corti*. *Micron* 2013;44:185-192. [dx.doi.org/10.1016/j.micron.2012.06.008](https://doi.org/10.1016/j.micron.2012.06.008).
62. Etges FJ, Marinakis V. Formation and excretion of calcareous bodies by the metacestode (Tetrathyridium) of *Mesocestoides vogae*. *J Parasitol* 1991;77(4):595-602.

63. Vargas-Parada L, Laclette JP. Role of calcareous corpuscles in cestode physiology: A review. *Rev Latinoam Microbiol* 1999;41(4):303-307.
64. Khin SS, Kitazawa R, Htet K, Htike HM, Yee TT, Aung M, Haraguchi R, Kitazawa S. Intestinal inflammatory pseudotumor caused by taeniasis: Calcareous corpuscles as a diagnostic clue. *Pathol Int* 2013;63(3):193-194.
65. Loos JA, Caparros PA, Nicolao MC, Denegri GM, Cumino AC. Identification and pharmacological induction of autophagy in the larval stages of *Echinococcus granulosus*: an active catabolic process in calcareous corpuscles. *Int J Parasitol* 2014;44(4):415-427.
66. Yang HJ. Immunoblot findings of calcareous corpuscles binding proteins in cyst fluid of *Taenia solium* metacestode. *Korean J Parasitol* 2004;42(3):141-143.
67. Park YK, Park JH, Guk SM, Shin EH, Chai JY. A new method for concentration of proteins in the calcareous corpuscles separated from the spargana of *Spirometra erinacei*. *Korean J Parasitol* 2005;43(3):119-122.
68. Willms K, Fernández PAM, Jiménez JA, Landa A, Zurabián R, Juárez UME, Robert L. Taeniid tapeworm responses to *in vitro* glucose. *Parasitol Res* 2005;96: 296-301. [dx.doi.org/10.1007/s00436-005-1348-0](https://doi.org/10.1007/s00436-005-1348-0).
69. Araujo JM, de Araújo JV, Braga FR, Carvalho RO, Ferreira SR. Activity of the nematophagous fungi *Poconia chlamydospora*, *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on egg capsules of *Dipylidium caninum*. *Vet Parasitol* 2009;166(1-2):86-89.