

01694



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL**

**"EVALUACIÓN BIOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA DE UN
FASCIOLICIDA EXPERIMENTAL EN BOVINOS"**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

REMEDIOS YOLANDA VERA MONTENEGRO

TUTOR

DR. FROYLÁN IBARRA VELARDE

COMITÉ TUTORAL:

DR. HÉCTOR SUMANO LÓPEZ

DR. FELICIANO MILIÁN SUAZO

MÉXICO, D. F.

2005

m342598



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO DE EXAMEN DE GRADO DE DOCTOR

Presidente: Dr. Héctor Quiroz Romero

Secretario: Dr. Zeferino García Vázquez

Vocal: Dra. María Teresa Quintero Martínez

Vocal: Dr. Héctor Sumano López

Vocal: Dr. Feliciano Milián Suazo

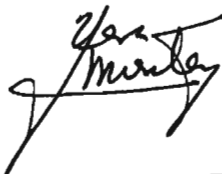
Suplente: Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón

Suplente: Dr. Froylán Ibarra Velarde

DECLARACIÓN

Esta tesis Doctoral es el resultado del trabajo de investigación del del autor, en ella se da el reconocimiento a las fuentes de información consultada.

El autor da su consentimiento a la División de estudios Superiores de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que dicha Tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio académico bibliotecario.



REMEDIOS YOLANDA VERA MONTENEGRO

*Lo que hacemos es solo una gota de agua en el océano, pero si el océano no
tuviera esa gota de agua, algo le faltaría.*

Teresa de Calcuta

DEDICATORIAS

A mis queridos padres José Vera Gómez y Guillermina Montenegro de Vera quienes me enseñaron el amor y el respeto a la vida. Gracias por todo su amor y apoyo incondicional.

A mis hijos José Alonso y Mariana Isabel quienes ocupan una parte muy importante en mi corazón, siendo el motor de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios doctorales.

Al CONACYT por el apoyo financiero del Proyecto: "Compuesto Alfa: Evaluación de su potencial antihelmíntico en bovinos" clave 34942-B con el cual fue posible la realización de los viajes, compra de animales e insumos para la conducción de los experimentos.

A la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DEGAPA) de la UNAM, por el financiamiento del Proyecto: "Evaluación biológica, farmacocinética y toxicológica de un fasciolicida experimental de producción mexicana en rumiantes" del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) clave IN 227998, por el apoyo financiero parcial para concretar algunos experimentos.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) de la UNAM por el apoyo recibido a través del proyecto "Fortalecimiento de la infraestructura para la Maestría y Doctorado en Parasitología y Ciencias de la Producción y Salud Animal", Proyecto PAEP clave 009006, con el cual fue posible adquirir diversos equipos que fueron de gran ayuda para este proyecto de tesis.

Al Dr. Froylán Ibarra Velarde, Tutor principal y profesor Titular del Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM; quien asesoró, colaboró y aportó su invaluable experiencia para realizar los objetivos y metas planteadas en este doctorado.

Al Dr. Héctor Quiroz Romero profesor emérito y jefe del departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM por su asesoría y participación en los trabajos realizados en Nautla, Veracruz y Hueytamalco, Puebla, así como el gran apoyo brindado para la realización y terminación de estos estudios.

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra y la M en C Alicia Hernández Campos, ambos profesores de la Facultad de Química de la UNAM por su invaluable amistad, asesoría y apoyo en la síntesis y elaboración del compuesto Alfa.

A mi Comité Tutoral y miembros del Jurado de examen de grado de doctor conformado por los Doctores Froylán Ibarra Velarde, Héctor Sumano López y Feliciano Milián Suazo, Héctor Quiroz Romero, Zeferino García Vázquez, Ma. Teresa Quintero Martínez y Germinal J Cantó Alarcón quienes tuvieron la paciencia de apoyarme y orientarme con sus comentarios; sugerencias y revisión de los informes semestrales, así como la tesis en su versión final.

Al Dr. Francisco Trigo Tavera ex – jefe de la División de Estudios de Posgrado y actual Director de la FMVZ-UNAM. A los Drs. Everardo González Padilla y Francisco Suárez Güemes, ex Coordinador y Coordinador del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y Salud Animal y al Dr. Javier Flores Covarrubias, Secretario Escolar del Posgrado de la FMVZ-UNAM, por sus finas atenciones y respectivos apoyos para participar en Congresos Nacionales e Internacionales así como en la impresión parcial de la tesis.

Al Dr. Pedro Ochoa Galván, del departamento de Genética y Bioestadística de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM y al M en C Samuel Marañón Herrera del departamento del Hombre y su Ambiente de la UAM-Xochimilco por su invaluable asesoría en los análisis estadísticos.

A los miembros del Departamento de Toxicología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, en especial al Dr. René Rosiles Martínez por su asesoría y acertados comentarios y recomendaciones; al MVZ Janitzio Bautista Ordoñez por su paciencia y enseñanza en lo concerniente a la estandarización de la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) para realizar el monitoreo del compuesto alfa en leche.

Al Dr. Jorge Rosete jefe del CIPEP- Las Margaritas - INIFAP, localizado en Hueytamalco, Puebla por autorizar la permanencia de los bovinos utilizados en el experimento Eficacia del compuesto Alfa contra fasciolas de 4 y 10 semanas de edad.

Al Dr. Javier Valencia Méndez, director del Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) - UNAM; por el apoyo otorgado para realizar los muestreos de leche en vacas tratadas con el compuesto Alfa, con el fin de llevar a cabo los estudios de cinética mediante CLAR.

Al Comité Estatal de Fomento y Protección Pecuaria rancho “GB”, Querétaro, Qro. por las facilidades prestadas para la realización de los estudios de Tolerancia y Dosis efectiva del compuesto Alfa y en forma particular a mi buen amigo y colaborador Dr. Germinal J. Cantó, investigador titular del CENID-Fisiología del INIFAP, quien brindó total apoyo para realizar con éxito los estudios mencionados.

Al Sr. Rodrigo Grappin del rancho “El Cocal” localizado en Nautla, Veracruz por permitirnos trabajar en sus instalaciones para realizar el estudio de Dosis efectiva con ganado fascioloso infectado en forma natural.

Al Dr. Carlos Vega y Murguía ex – Director del CENID-PAVET del INIFAP quien amablemente permitió conducir el estudio sobre Eficacia del compuesto Alfa contra fasciolas de diversas edades en este centro de investigación.

Al Dr. Marco Antonio Hidalgo propietario del rancho “Copalar” localizado en Monte Gordo, Veracruz. lugar donde se realizó el estudio comparativo sobre

Eficacia del compuesto Alfa con otros fasciolicidas comerciales en bovinos infectados en forma natural.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, quien a través de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y de su departamento de Parasitología me fue permitido aportar un granito de arena en el mundo tan extenso y maravilloso de la Parasitología Animal.

A mis amigos y compañeros del departamento de Parasitología de la FMVZ-UNAM quienes a través de nuestra convivencia diaria compartimos nuestras experiencias y deseos de ser cada día mejores parasitólogos

A los amigos y colegas del CENID-PAVET del INIFAP con quienes a través de varios años he compartido y disfrutado el placer de la investigación en las ciencias veterinarias.

A todas aquellas personas e instituciones nacionales e internacionales que de manera directa o indirecta hemos tenido el placer de compartir el descubrimiento, síntesis, evaluación y desarrollo del compuesto "Alfa".

RESUMEN

EVALUACIÓN BIOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA DE UN FASCIOLICIDA EXPERIMENTAL EN BOVINOS

Remedios Yolanda Vera Montenegro

El objetivo general fue determinar la eficacia y seguridad del compuesto alfa o 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxy)-1*H*-bencimidazol contra *Fasciola hepatica* en bovinos. Para ello se realizaron 6 experimentos los cuales tuvieron como objetivos específicos el de determinar la dosis efectiva del compuesto en bovinos infectados en forma natural y experimental. Evaluar su eficacia contra fasciolas de diversas edades en becerras infectadas en forma experimental. Comparar bajo condiciones de campo, la eficacia del producto con tres fasciolicidas comerciales. Determinar la máxima dosis tolerada (MDT) para obtener el índice de seguridad (IS), así como posibles alteraciones en los parámetros bioquímicos, hematológicos y constantes fisiológicas en bovinos tratados con el compuesto. Determinar mediante un ensayo cromatográfico la permanencia de residuos en leche de bovinos. Los resultados obtenidos mostraron eficacia y seguridad comparable a aquella reportada para los mejores fasciolicidas disponibles a nivel mundial. Se concluye que el compuesto experimental Alfa es un antihelmíntico de diseño, síntesis y producción mexicana, altamente eficaz y seguro para utilizarse en programas epidemiológicos y de control de infecciones por *Fasciola hepatica* en bovinos. Se publicaron cuatro artículos científicos y dos más están en proceso de revisión, los cuales se resumen individualmente a continuación.

Experimento 1 (Artículo 1)

Determinación de la dosis efectiva de un fasciolicida experimental en ganado infectado en forma natural y experimental. *F Ibarra Velarde, Y Vera Montenegro, H Quiroz Romero, J Cantó Alarcón, R Castillo Bocanegra, A Hernández Campos, P Ochoa Galván.* Vet Parasitol 2004: 120; 65-74.

El objetivo del presente estudio fue el de determinar la dosis efectiva de un fasciolicida experimental llamado compuesto Alfa o 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol en bovinos infectados en forma natural y experimental. En un primer experimento se utilizaron 24 toretes libres de la infección por *Fasciola hepatica* los cuales fueron infectados cada uno con 800 metacercarias de *Fasciola hepatica* y reinfectados en el día 45 con otras 600 metacercarias por animal. En el día 75, cuando los animales tenían fasciolas entre 4 y 10 semanas de edad respectivamente, estos fueron divididos en 4 grupos (G) de 6 animales cada uno de acuerdo a los conteos de huevos de fasciola. Los grupos 1 al 3 recibieron el compuesto Alfa a dosis de 10, 12 y 14 mg/kg/ per os; respectivamente. El G4 permaneció como control sin tratamiento. A los 20 días posteriores al tratamiento los animales fueron sacrificados para coleccionar las fasciolas presentes. La eficacia fue medida como porcentaje de reducción de huevos o fasciolas con relación al grupo sin tratamiento. En un segundo experimento, se utilizaron 24 novillos positivos a huevos de fasciola los cuales tenían una infección en forma natural. Estos fueron divididos en 4 grupos de 5 animales cada uno. Los grupos 1 al 3 recibieron el compuesto Alfa a dosis de 10, 12 y 14 mg/kg/po; respectivamente. El grupo 4 sirvió como control sin tratamiento. Todos los procedimientos para determinar eficacia se llevaron a cabo tal y como se mencionó en el primer experimento. Los resultados en el primer estudio mostraron un porcentaje de reducción de huevos de 97.3, 100 y 100 y el promedio general de reducción de fasciolas fue de 94.3, 100 y 100 para los grupos 1 al 3 respectivamente. En el segundo estudio, el porcentaje de reducción de huevos fue 87.5, 99.1 y 100 y la eficacia promedio de reducción de fasciolas fue 84.2, 99.6 y 100 para los grupos 1 al 3 respectivamente. Se concluye que la dosis efectiva seleccionada para el compuesto alfa fue de 12 mg/kg/p.o en ganado que tenía una infección inducida o natural por *Fasciola hepatica*.

Palabras claves: *Fasciola hepatica*; Quimioterapia experimental; bovinos.

Experimento 2 (Artículo 2)

Eficacia del 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol contra *Fasciola hepatica* de 4 y 10 semanas de edad en bovinos. Y Vera Montenegro, F Ibarra Velarde, H Quiroz Romero, A Ríos Utrera, R Castillo Bocanegra, A Hernández Campos. Vet Méx 2001; 32(1):77-80.

El objetivo del presente estudio fue el de evaluar la eficacia fasciolicida del 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol denominado compuesto Alfa contra Fasciolas de 4 y 10 semanas de edad en bovinos. Se utilizaron 15 novillos libres de infección por *Fasciola hepatica* los cuales se infectaron por vía oral con 300 metacercarias administradas 150 en el día 0 y 150 en el día 45. A todos los bovinos se les tomaron muestras de heces para corroborar la presencia del parásito mediante análisis coprológicos. En el día 75, los grupos 1 y 2 fueron tratados con los compuestos Alfa y Triclabendazol a una dosis única de 12 mg/kg,vía oral. El grupo 3 quedó como testigo sin tratamiento. A los 45 días postratamiento, todos los bovinos fueron sacrificados para separar el hígado y cuantificar los vermes presentes. La eficacia se midió con base en el número de fasciolas presentes en los grupos tratados con respecto al testigo. Los resultados indicaron un 100% y un 99.4% de reducción de fasciolas de 4 y 10 semanas de edad respectivamente para el compuesto Alfa, y de 100% para el triclabendazol contra fasciolas de 4 y 10 semanas de edad. No se observaron diferencias estadísticas con respecto a la eficacia de ambos antihelmínticos. Con referencia a la distribución de tallas de fasciolas obtenidas se observó un pico principal de 73 fasciolas con tallas que oscilaban entre 30.1 a 35 mm, encontrando fasciolas de 20.1 mm hasta 45.0 mm de longitud. La talla menor de fasciolas encontradas fue de 20.1 mm y la talla mayor fue de 43.1 mm. Se concluye que el compuesto Alfa mostró alta eficacia contra fasciolas de 4 y 10 semanas de edad.

Palabras claves: Eficacia; Fasciolicida experimental; bovinos.

Experimento 3 (Artículo 3)

Evaluación de la eficacia del compuesto alfa contra fasciolas de diversas edades en bovinos Y Vera Montenegro, F Ibarra Velarde, E Liébano

Hernández, H Quiroz Romero, R Castillo Bocanegra, A Hernández Campos, P Ochoa Galván. Parasitol Res 2004; 92: 211-214.

El objetivo del presente estudio fue el de evaluar la eficacia del 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1*h*-benzimidazol llamado compuesto alfa, contra *Fasciola hepatica* de diversas edades. Para ello se utilizaron 32 vaquillas libres de la infección por fasciola, las cuales se dividieron en 8 grupos siendo infectados con 150 metacercarias por animal. Posteriormente todos los animales recibieron una segunda infección con otras 150 metacercarias dosificadas a diferentes intervalos con la finalidad de producir fasciolas de diferentes edades en los animales experimentales. Cuando las fasciolas alcanzaron la edad requerida en las vaquillas se trataron cuatro grupos con una dosis oral de 12mg/kg del compuesto alfa y los animales remanentes sirvieron como testigos sin tratamiento. A las dos semanas posteriores al tratamiento todos los bovinos fueron sacrificados y sus hígados removidos para determinar el número de parásitos presentes en los grupos tratados y no tratados. En los grupos tratados el porcentaje de reducción de fasciolas de 3días/2semanas fue de 100%, en el de 3/4 semanas fue de 96.4%, en el de 6/8 semanas fue de 99% y para el grupo de 10/12 semanas fue de 100%. Se concluye que el compuesto alfa mostró una eficacia altamente promisionaria contra fasciolas de diversas edades en vaquillas infectadas experimentalmente.

Palabras claves: *Fasciola hepatica*, Quimioterapia; bovinos.

Experimento 4 (Artículo 4)

Evaluación de campo sobre la eficacia de un fasciolicida experimental comparado con algunos compuestos comerciales en ganado infectado en forma natural. Y Vera Montenegro, F Ibarra Velarde, H Quiroz Romero, A Hernández Campos, R Castillo Bocanegra. Parasitol Res 2003;91:1- 4.

Se comparó la eficacia del 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1*h*-benzimidazol llamado compuesto Alfa, utilizando tres fasciolicidas comerciales a través del porcentaje de reducción de huevos de *Fasciola hepatica* en bovinos infectados en forma natural. Se utilizaron 50 vacas suizas de 1 – 6 años de edad, previamente determinados como positivos a huevos de parásito mediante la

técnica de sedimentación. Los animales se dividieron en cinco grupos (G) de 10 cada uno de acuerdo a los conteos fecales de huevos. El G1 recibió el compuesto Alfa a una dosis de 12 mg/kg por vía oral. El G2 Triclabendazol a 12 mg/kg por vía oral. El G3 Closantel a 3.5 mg/kg por vía subcutánea. El G4 Clorsulón a 2.0 mg/kg subcutáneo. El G5 sirvió como testigo sin tratamiento. Se tomaron muestras de heces los días 0, 7, 14, 21, 28, 60 y 90 días. La Eficacia se midió en los días 14 y 21. Adicionalmente se determinó el Efecto de Extensión (EE) y el Efecto de Intensidad (EI) los cuales se evaluaron en el día 60. Los porcentajes de eficacia para los grupos 1 al 4 fueron de 98.1, 98.7, 98.2 y 97.9 en el día 14 y de 98.5, 97.9, 97.7 y de 97.9 en el día 21, respectivamente. No se observaron diferencias estadísticas entre los grupos tratados.

Palabras claves: *Fasciola hepatica*; Fasciolicida experimental; Fasciolicidas comerciales.

Experimento 5

Determinación de dosis máxima tolerada e índice de seguridad del compuesto Alfa en bovinos. Yolanda VERA; Froylán IBARRA; Germinal-Jorge CANTO; Olivia SORIA; Alicia HERNANDEZ (sometido a Vet Res).

El objetivo del trabajo fue el de determinar la Dosis Máxima Tolerada (DMT) y el Índice de Seguridad (IS) del 5-cloro-2-metiltilio-6-(1-naftiloxi)-1*H*-benzimidazol llamado compuesto Alfa en bovinos. Así como posibles efectos adversos después del tratamiento. Se realizaron mediciones de 14 parámetros bioquímicos, 13 hematológicos y 4 constantes fisiológicas. Se utilizaron dieciocho bovinos criollos que pesaban entre 200 y 300 kg. los cuales fueron divididos en 6 grupos de tres animales cada uno. En el día 0, los grupos 1 al 5 recibieron el compuesto a las dosis de 12, 36, 60, 120 y 180 mg/kg/p.o., respectivamente. El grupo 6 sirvió como testigo sin tratamiento. Posteriormente se obtuvieron muestras sanguíneas y suero de cada animal a las 0, 4, 8, 16, 32, 128 y 720 horas después del tratamiento. Los parámetros bioquímicos analizados fueron AST, GGT, DHL, glucosa, proteína total, albúminas, globulinas, bilirubina, creatinina, nitrógeno ureico, ácido úrico, colesterol total,

fosfatasa alcalina, fósforo. Los análisis de Biometría hemática fueron hematocrito, hemoglobina, eritrocitos, VGM, CHGM, plaquetas, leucocitos totales, neutrófilos segmentados, neutrófilos en banda, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos. En lo referente a Constantes Fisiológicas se midió la temperatura rectal, frecuencia respiratoria, frecuencia cardíaca y movimientos ruminales. Los resultados obtenidos fueron sometidos a un Análisis de Varianza para determinar posibles diferencias significativas ($P < 0.05$), cuando las hubo, estas fueron analizadas mediante la prueba de Tukey. Los resultados indicaron que no hubo diferencias entre los parámetros evaluados cuando fueron comparados con los valores de referencia, reportados en la literatura, excepto en el grupo tratado con 15 veces la dosis clínica recomendada ($P < 0.05$). Con respecto a los indicadores de las constantes fisiológicas, no se determinaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre las variables ni tampoco entre los intervalos de tiempo en los muestreos entre grupos, excepto en la frecuencia respiratoria y frecuencia cardíaca en el grupo tratado con 180 miligramos ($P < 0,05$). Se concluye que la DMT del compuesto Alfa para los bovinos fue de 180 mg/kg/p.o, correspondiendo a un IS de 15 veces la dosis clínica recomendada para bovinos.

Palabras claves: Fasciolicida experimental; Máxima dosis tolerada; Toxicidad; bovinos.

Experimento 6

Ensayo cromatográfico de la cinética del compuesto Alfa en leche de bovinos. Y Vera Montenegro, J Bautista Ordoñez; F Ibarra Velarde; R Rosiles Martínez; A Hernández Campos; R Castillo Bocanegra. (en proceso de publicación).

El compuesto Alfa o 5-Cloro-6-(1-naftiloxi)-2-metiltio-1H-bencimidazol ha mostrado altos porcentajes de eficacia contra *Fasciola hepatica* en ovinos y bovinos. El objetivo del presente estudio fue el de determinar mediante un ensayo cromatográfico la permanencia de residuos del compuesto Alfa postratamiento en leche de vacas en pleno estado de producción.

Se utilizaron 14 vacas de raza holstein frieisian entre 3 y 6 años de edad las cuales fueron tratadas con una dosis oral de 12 mg/kg. Seguidamente se tomaron muestras de leche de aproximadamente 250 ml por animal a las 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 48, 64, 72, 128, 256, 512 y 1024 horas. Las muestras se almacenaron a -70° C para su posterior análisis. Posteriormente, se utilizó un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución utilizando una columna con un detector de arreglo de diodos a 304 nm. Las muestras fueron previamente lavadas con un cartucho de partición líquido-sólido. Posteriormente se realizó la determinación de las constantes cinéticas de primer orden para el compuesto Alfa. Los resultados indicaron que a pesar de la alta sensibilidad de la técnica, no se detectaron valores del compuesto Alfa, ni de su metabolito sulfóxido en las muestras analizadas. Se concluye que el tiempo de retención del compuesto Alfa es de 5.40 min y el límite de detección para su metabolito sulfóxido es de 12 ng/ml en las siguientes 72 horas postratamiento. Estos resultados indicaron también que el compuesto Alfa podría ser eliminado en leche a concentraciones menores que aquellas esperadas.

Palabras claves: Fasciolicida experimental; CLAR; leche; bovinos.

SUMMARY

BIOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL EVALUATION OF AN EXPERIMENTAL FASCIOLICIDE IN CATTLE

Remedios Yolanda Vera Montenegro

The aim of the present project, was to determine the efficacy and safety of an experimental fasciolicide called compound "Alpha" or 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)1*H*-benzimidazole against *Fasciola hepatica* in cattle. Six experiments were carried out having as specific objectives to determine the effective dose of the compound in naturally and experimentally infected bovines; to evaluate its efficacy against different stages in calves experimentally infected; to compare under field conditions the efficacy of compound alpha with another three commercial fasciolicides; to determine the maximum tolerated dose (MTD) aimed to obtain the safety index (SI), as well as to detect possible alterations in their biochemical, hematological and physiological parameters in treated animals; to determine the permanence of residues in milk by high performance liquid chromatography. The results showed highly promising efficacy and safety comparable with that reported for the best fasciolicides available around the world. It was concluded that compound Alpha is an anthelmintic of design, synthesis and mexican production, highly efficacious and secure to be used in epidemiological programs to control infections of *Fasciola hepatica* in cattle. From this research, four scientific articles were published and two more are in progress and they are individually summarized as follows.

Experiment 1 (Article 1)

Determination of the effective dose of an experimental fasciolicide in naturally and experimentally infected cattle. *F Ibarra Velarde; Y Vera Montenegro; H Quiroz Romero; J Cantó Alarcón; R Castillo Bocanegra; A Hernández Campos; P Ochoa Galván.* Vet Parasitol 2004: 120; 65-74.

The aim of the present study was to determine the effective dose of an experimental fasciolicide called compound Alpha or 5-chloro-2-methylthio-6-(1-

naphthyloxy)1*H*-benzimidazole in experimentally and naturally infected cattle. In the first experiment twenty-four, fluke-free heifers were each infected with 800 metacercariae of *Fasciola hepatica* and re-infected on day 45 with other 600 cysts per animal. On day 75, when the animals had 4 and 10 week-old-flukes respectively, they were divided into 4 groups (G) of 6 animals each according to fluke egg counts. Groups 1 to 3 received compound alpha at 10, 12 and 14 mg/kg per os, respectively. G4 remained as an untreated control. Twenty days after treatment, the animals were sacrificed for the recovery of flukes. Efficacy was assessed as a percentage of egg or fluke reduction relative to the untreated control. In the second experiment (Naturally infected cattle), twenty four-year-old steers positive to *F. hepatica* eggs were blocked into four groups of five animals each. Groups 1 to 3 received compound alpha at 10, 12 and 14 mg/kg/p.o., respectively. Group 4 served as a non-treated control. All procedures to determine efficacy were carried out as mentioned in the first experiment. The results in the first study showed a percentage on egg reduction of 97.3, 100 and 100 and overall fluke reduction of 94.3, 100 and 100 for groups 1 to 3, respectively. In the second study, the percentage of egg reduction was of 87.5, 99.1 and 100 and overall efficacy regarding fluke reduction was of 84.2, 99.6, and 100 for groups 1 to 3, respectively. It is concluded that the effective dose selected for compound alpha was of 12 mg/kg/per os in cattle having an induced or natural *F. hepatica* infection.

Keywords: *Fasciola hepatica*; Experimental chemotherapy; Cattle.

Experiment 2 (Article 2)

Efficacy of the 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthyloxy)-1*h*-benzimidazole against 4 and 10 week-old *Fasciola hepatica* in cattle. Y Vera Montenegro, F Ibarra Velarde, H Quiroz Romero, A Ríos Utrera, R Castillo Bocanegra, A Hernández Campos. Vet Méx 2001; 32(1):77-80.

The aim of this study was to evaluate the fascioliscide efficacy of 6-chloro-2-metilthio-5-(1-naftiloxi) bencimidazol called compound "alfa" against 4 and 10 week-old flukes in cattle. Fifteen *Fasciola hepatica* fluke-free steers were divided into 3 groups of 5 animals each. Each animal was orally infected with

300 metacercariae given 150 on day 0 and 150 on day 45. All animals were sampled for faeces to determine the presence of *Fasciola*-eggs by mean of coprological analysis. On day 75 Groups 1 and 2 were treated with compound alfa and triclabendazol at a dose of 12 mg/kg per os, respectively. Group 3 remained as the non-treated control. Forty five days after treatment, all animals were sacrificed; the liver was isolated to count the flukes. Efficacy was assessed on the number of flukes present in the treated groups in relation to the control one. Results indicated an efficacy of 99.4% for compound alfa, and of 100% for triclabendazol, respectively. It is concluded that compound alfa exerted a high efficacy against 4 and 10 week-old flukes.

Keywords: Efficacy; Experimental fasciolicide; Cattle.

Experiment 3 (Article 3)

Efficacy of an experimental fasciolicide against immature and mature *Fasciola hepatica* in artificially infected calves. Y Vera Montenegro, F Ibarra Velarde, E Liébano Hernández, H Quiroz Romero, R Castillo Bocanegra, A Hernández Campos, P Ochoa Galván. Parasitol Res 2004; 92: 211-214.

The efficacy of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthyloxy)-1*h*-benzimidazole, called "Alpha", was tested against *Fasciola hepatica*. Fluke-free calves (n=32) were divided into 8 groups and infected with 150 metacercariae per animal. Afterwards, all animals received a 2nd infection with other 150 metacercariae, these given at different intervals of time aimed to have different age of flukes. When the flukes reached the required age in the animals, four groups(G) were treated with a single oral dose of 12 mg/kg of compound alpha and the remaining ones served as non-treated controls. Two weeks after treatment the animals of all groups were sacrificed and the livers were removed to access the numbers of parasites present in the treated and untreated controls. In the treated groups there was a fluke reduction for 3 day, 2 weeks of 100%, for 3 and 4 weeks of 96.4%, for 6 and 8 weeks of 99.2% and for 10 and 12 week-old flukes of 100%, respectively.

Keywords: *Fasciola hepatica*, Chemotherapy; cattle.

Experiment 4 (Article 4)

Field trial on the efficacy of an experimental fasciolicide compared with some commercial compounds in naturally infected cattle. *Y Vera Montenegro, F Ibarra Velarde, H Quiroz Romero, A Hernández Campos, R Castillo Bocanegra.* Parasitol Res 2003; 91:1- 4.

The efficacy of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1*H*-benzimidazole, was evaluated with three commercial fasciolicides through the percentage of egg-reduction in cattle. Fifty Swiss cows were selected for inclusion in the trial based on finding eggs of the trematode in the feces. On day 0, they were blocked in five groups (G) of ten animals each according to fecal egg counts. G1. Received compound alpha at 12mg/kg/po.; G2. triclabendazole at 12 mg/kg/po.; G3. closantel at 3.5 mg/kg/sc.; G4. clorsulon at 2.0 mg/kg/sc. G5. Served as non-treated control. Fecal analysis were performed on days 0, 7, 14, 21, 28, 60 and 90. Efficacy was measured on days 14 and 21. In addition, the Extension and Intensity effects were determined on day 60. The percentage of efficacy for groups 1 to 4, was 98.1, 98.7, 98.2 and 97.9 on day 14 and 98.5, 97.9, 97.7 and 97.9 on day 21, respectively. No statistical differences were observed between treated groups.

Keywords: *Fasciola hepatica*; Experimental fasciolicide; Commercial fasciolicides.

Experiment 5

Determination of the maximum tolerated dose and the safety index of an experimental fasciolicide in cattle. *Yolanda VERA; Froylán IBARRA; Olívia SORIA; Germinal-Jorge CANTO; Alicia HERNANDEZ* (submitted to Veterinary Research).

The aim of the present study was to determine the maximum tolerated dose (MTD) and the safety index (SI) of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1*H*-benzimidazole, called compound alpha, in cattle. In addition, in the search for possible adverse effects after treatment, the measurement of 14 biochemical, 13 hematological and 4 physiological parameters were also analyzed. Eighteen

crossbred heifers weighing between 200 and 300 Kg. were divided into 6 groups of three animals each. Groups 1 to 5 received a single oral dose of 12, 36, 60, 120 and 180 mg/Kg of body weight (bw) of compound alpha. Group 6 served as an untreated control. To determine the biochemical, hematological and enzymatic parameters, sera and blood samples were individually taken at 0, 4, 8, 16, 32, 128, and 720 hs after treatment. Physiological parameters such as rectal temperature (RT), heart rate (HR), respiration rate (RR) and ruminal movements (RM) were measured at the time intervals mentioned above. Estimation of the MTD and SI was obtained by using the formula reported by the Food and Drug Administration (FDA), the results showing an MTD of 180 mg/kg/bw and an SI of 15 times the recommended clinical dose. Some statistical differences were observed in a few of the biochemical, hematological and enzymatic parameters, the adverse effects being not highly representative. Alterations on HR and RR were statistically different only in heifers treated with 180 mg. It is concluded that compound alpha provides a wide margin of safety at the recommended doses for cattle.

Keywords: cattle / *Fasciola hepatica* / safety index /experimental fasciolicide

Experiment 6

Chromatographic assay for kinetics of a new experimental fasciolicide in milk from cattle. Y Vera Montenegro, J Bautista Ordoñez, F Ibarra Velarde; R Rosiles Martínez; A Hernández Campos; R Castillo Bocanegra. (en proceso de publicación).

Compound alpha or 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthyloxy)1*H*-benzimidazole has shown high percentages of efficacy against *Fasciola hepatica* in sheep and cattle. The aim of the present study was to determine the permanence of residues of compound alpha in milking cows by mean of high performance liquid chromatography. Fourteen Holstein Friesian cows aged between 3-6 years were treated orally once with 12 mg/kg. Afterwards, milk samples were taken (250 ml/animal) at 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 48, 64, 72, 128, 256, 512 and 1024 hours. Samples were stored at -70°C for further analysis. High Performance Liquid Chromatography analysis (HPLC) was conducted using a

reverse phase column with diode array detector at 304 nm. Samples were previously cleaned by a liquid–solid partition cartridge. Afterwards, determination of kinetic constants of first order for compound alpha were identified. Results indicated that beside the high sensitivity of the technique, the values of compound alpha and its sulphoxide metabolite were not detected in these samples. It was concluded that the retention time for compound alpha is 5.40 min and the detection limit for its metabolite is of 12 ng/ml in the following 72 hours posttreatment. These results indicated as well, that the compound alpha could have been eliminated in milk at concentrations lower than those expected.

Keywords: Experimental fasciolicide; HPLC; milk; cattle.

INDICE DE CUADROS

Cuadro I.	Eficacia comparativa de los principales fasciolicidas en bovinos	12
Cuadro II.	Solubilidad del compuesto Alfa en diferentes pH y disolventes	17
Cuadro 1.1	Eficacia del compuesto Alfa contra <i>Fasciola hepatica</i> inmaduras y adultas en toretes infectados en forma experimental.....	43
Cuadro 1.2	Eficacia del compuesto Alfa contra diferentes estadios de <i>Fasciola hepatica</i> en toretes infectados en forma natural.....	44
Cuadro 2.1	Eficacia fasciolicida de los compuestos Alfa y Triclabendazol en bovinos.....	53
Cuadro 3.1	Eficacia del compuesto Alfa contra fasciolas de diversas edades en vaquillas infectadas experimentalmente.....	67
Cuadro 3.2	Número de trematodos de diversas edades recuperados de vaquillas infectadas con <i>Fasciola hepatica</i> tratadas y no tratadas con el compuesto Alfa.....	68
Cuadro 3.3	Frecuencia de distribución de <i>F. hepatica</i> de acuerdo a la longitud de fasciolas en vaquillas infectadas con 300 metacercarias tratadas y no tratadas con el compuesto.....	69
Cuadro 4.1	Comparación de la eficacia del compuesto Alfa con otros fasciolicidas en bovinos infectados en forma natural con <i>Fasciola hepatica</i>	78
Cuadro 4.2	Efecto de Extensión e Intensidad de los compuestos evaluados en bovinos infectados en forma natural con <i>Fasciola hepatica</i>	79
Cuadro 5.1	Parámetros bioquímicos de sueros de bovinos tratados con diferentes dosis del compuesto Alfa.....	106
Cuadro 5.2	Parámetros hematológicos de sueros de bovinos tratados con diferentes dosis del compuesto Alfa.....	109
Cuadro 5.3	Constantes fisiológicas de los bovinos tratados a diferentes dosis con el compuesto Alfa	111

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura del compuesto Alfa.....	17
Figura 1.1	Distribución de talla de fasciolas recuperadas de los novillos no tratados e infectados en forma experimental.....	45
Figura 1.2	Distribución de talla de fasciolas recuperadas del grupo testigo en toretes infectados en forma natural.....	45
Figura 2.1	Distribución de tallas de fasciolas recuperadas en el grupo testigo.....	54
Figura 4.1	Prevalencia de fasciolosis postratamiento con el compuesto Alfa y otros fasciolicidas en bovinos infectados en forma natural	80
Figura 5.1.1	Comportamiento general de los parámetros bioquímicos de sueros de bovinos tratados a diferentes dosis del compuesto Alfa	104
Figura 5.1.2	Comportamiento general de los parámetros bioquímicos de sueros de bovinos tratados a diferentes dosis del compuesto Alfa (continuación).....	105
Figura 5.2.1	Comportamiento general de los parámetros hematológicos de sueros de bovinos tratados a diferentes dosis del compuesto Alfa	107
Figura 5.2.2	Comportamiento general de los parámetros hematológicos de sueros de bovinos tratados a diferentes dosis del compuesto	

Alfa (continuación).....	108
Figura 5.3 Comportamiento general de las constantes fisiológicas de los bovinos tratados a diferentes dosis del compuesto Alfa	110
Figura 6.1 metabolito sulfóxido (estandar).....	119
Figura 6.2 metabolito sulfona (estandar).....	119
Figura 6.3 leche 1 hora.....	119
Figura 6.4 leche 8 horas.....	119
Figura 6.5 leche 16 horas.....	120
Figura 6.6 leche 32 horas.....	120
Figura 6.7 leche 64 horas.....	120
Figura 6.8 leche 72 horas.....	120

I. INTRODUCCIÓN

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria de distribución mundial, causada por el trematodo *Fasciola hepatica* que se localiza en el hígado y conductos biliares de los ovinos, bovinos, caprinos, cerdos, equinos, conejos, venados y en ocasiones el hombre (Quiroz, 2000^a).

En México se le conoce también a la enfermedad con los nombres de distomatosis hepática, conchuela del hígado, hígado picado, hígado podrido, mal de botella, palomilla. (Quiroz, 2000^a).

Es una enfermedad de gran importancia ya que provoca un proceso inflamatorio generalmente crónico del hígado y conductos biliares, ocasionando trastornos digestivos y de la nutrición (Soulsby, 1987).

Por otro lado, las características epidemiológicas y de transmisión de la fasciolosis hacen que la enfermedad tenga una distribución irregular; los focos guardan relación con su distribución geográfica la cual corresponde a la de los hospederos intermediarios, que son caracoles dulceacuícolas pulmonados principalmente del género *Fossaria* (Malek, 1962; Milián, 1986; Vera, 1987).

Mas Coma, (1999) menciona que no procede hablar de las características de la fasciolosis a nivel de los países, sino más bien de las correspondientes a una determinada zona fisiográfica y climáticamente homogénea.

Los estudios sobre el terreno y en el laboratorio han demostrado que la fasciolosis tiene una gran capacidad de propagación, que guarda relación con la capacidad de ampliación de nichos ecológicos de los limneidos huéspedes intermediarios y con la considerable capacidad de colonización y adaptación del parásito. También

estos trematodos han puesto en práctica distintas estrategias de adaptación que permiten tasas más elevadas de transmisión del parásito (Mas Coma, 1999).

Morfología

Fasciola hepatica es un platelminto hermafrodita de cuerpo ancho y aplanado dorsoventralmente que mide de 18 - 51 X 4 – 13 mm. Posee dos ventosas muy proximas, la ventral más grande que la oral y un proceso cónico en su extremo anterior donde se encuentra la boca.

Los órganos internos que conforman el aparato digestivo y reproductor son muy ramificados, especialmente los ciegos que son largos y con numerosos divertículos laterales. Los dos testículos ocupan la parte media corporal. El cirro está bien desarrollado y la bolsa del cirro incluye también a la próstata y la vesícula seminal. Cuenta con un solo ovario y el útero se localiza anteriormente a los testículos.

Las glándulas vitelógenas o de la vitelaria están formadas por finos folículos, que ocupan los márgenes laterales del trematodo. Los conductos de los folículos se unen formando dos transversales que drenan en la glándula de Mehlis, desde la cual comunican con el ootipo.

El tegumento está cubierto por numerosas espinas dirigidas hacia atrás (Rojo Vázquez, 1999).

Los huevos miden de 130 a 150 X 63 a 90 micras, posee un opérculo y su cáscara es relativamente delgada la cual está teñida por pigmentos biliares de tonos amarillos en su interior. Entre numerosas células vitelinas yace el cigoto de color claro y posición central (Quiroz, 2000^a).

Taxonomía

Según Manga (1999), la clasificación que corresponde a este trematodo es la siguiente:

Phylum :	Platyhelminthes	Gegenbaur, 1859
Clase:	Digenea	Van Beneden, 1858
Superorden:	Anepitheliocystidia	La Rue, 1957
Orden:	Echinostomatida	Odhner, 1905
Familia:	Fasciolidae	Railliet, 1895
Género:	<i>Fasciola</i>	Linnaeus, 1758

Ciclo Biológico

Dalton (1999), resume el ciclo de vida de *F. hepatica* en 6 fases que son:

(I) eliminación de los huevos con las heces del huésped definitivo; (II) desarrollo de los huevos; (III) vida libre de los miracidios en el agua, en busca de un caracol hospedador *Lymnaea sp* (*Fossaria sp*); (IV) desarrollo y multiplicación del parásito en el caracol; (V) emergencia de las cercarias de los caracoles y enquistamiento sobre plantas o en el agua; (VI) ingestión de la metacercaria infectiva por el huésped definitivo y desarrollo del parásito adulto.

El parásito adulto se localiza en los conductos biliares del hospedero definitivo donde vierte sus huevos, los cuales pasan al duodeno junto con la bilis y de ahí son evacuados con las heces. En condiciones de temperatura (26° C) y humedad (80%) adecuadas, los huevos se desarrollan y eclosionan aproximadamente entre 2 y 3 semanas. Los huevos no eclosionan hasta estar libres en el agua, pues las condiciones anaerobias de las masas fecales impiden su desarrollo. La primera fase larvaria, **el miracidio**, es ciliado y posee dos manchas oculares semilunares.

Pueden vivir libres en el agua hasta 24 horas, perdiendo su capacidad de penetrar al caracol entre las tres a seis horas posteriores a su eclosión. Al aproximarse a un caracol hospedador intermediario adecuado, como *Lymnaea sp*, los receptores quimiotácticos los dirigen hacia las sustancias del mucus. Una vez en contacto con los caracoles, los miracidios giran sobre su eje mayor virtiendo una secreción histolítica que facilita su entrada, penetran en ellos por la cavidad respiratoria o a través del tegumento del pie, pierden la cubierta ciliada, pasan a los canales linfáticos y a los vasos sanguíneos, alojándose en la glándula digestiva, donde se transforma en la segunda fase larvaria el **esporocisto**; en un lapso de 14 días, cada esporocisto produce y libera de 5 a 8 **redias**, que se transportan al hepatopáncreas del caracol. Cada redia da origen a redias hijas y cercarias. La **cercaria** es la última fase evolutiva que parasita al caracol, con un promedio de 9 a 649 por miracidio; después de 4 a 6 semanas las cercarias abandonan a las redias a través de su abertura tocológica y al caracol por su aparato respiratorio.

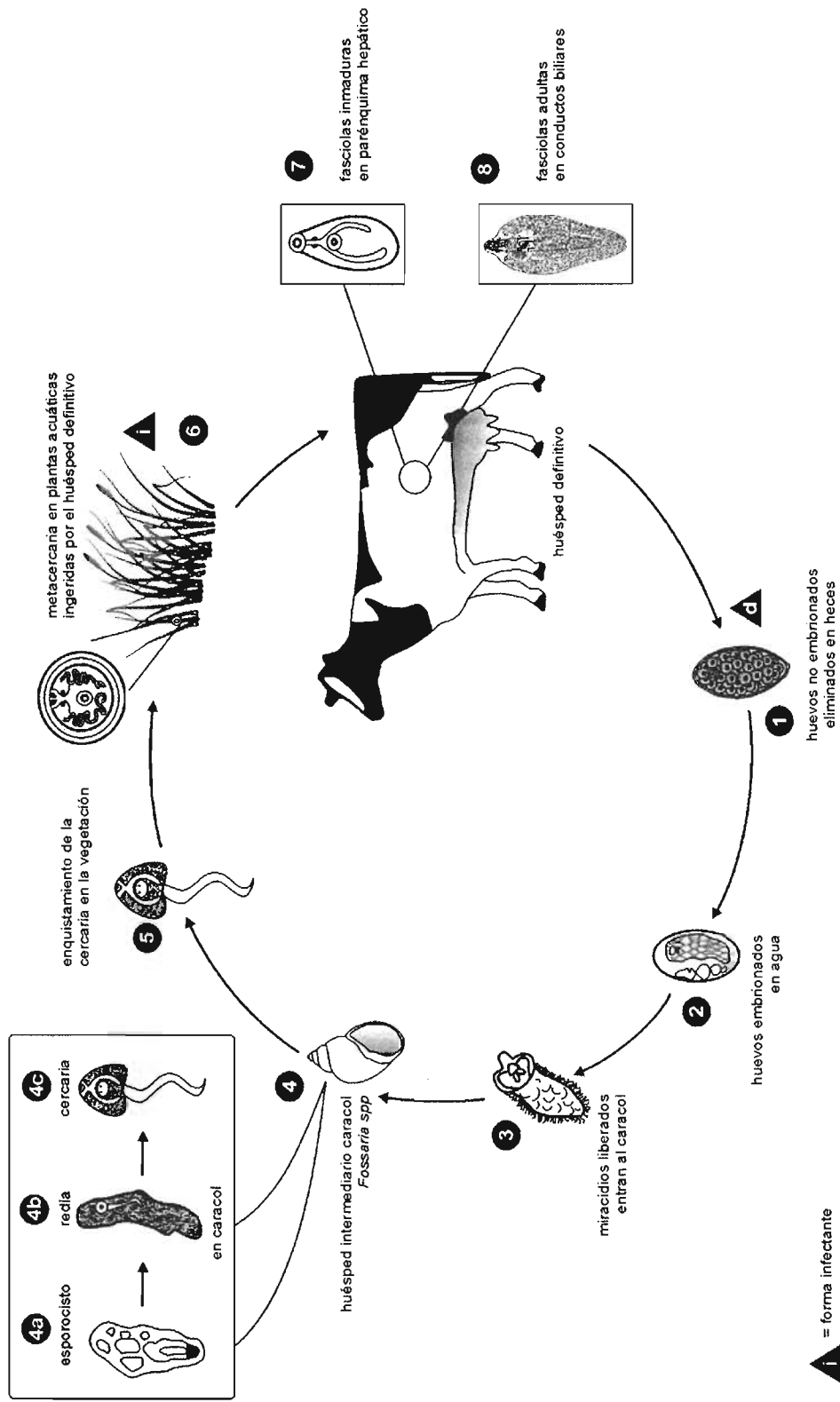
Una vez fuera requieren de un medio acuático para sobrevivir; durante la época de sequía o a temperaturas muy bajas las cercarias pueden permanecer por periodos prolongados dentro del caracol, saliendo al inicio de las lluvias y/o al elevarse la temperatura ambiental.

En el agua, las cercarias se adhieren a objetos, especialmente plantas o a la superficie inferior de la película superficial del agua; pierden su color y segregan a su alrededor un quiste de doble pared. El enquistamiento se completa de 20 a 30 minutos formando las **metacercarias**. La metacercaria mide aproximadamente 0.2 mm es redondeada, de color blanquecino, requiere de 24 horas para madurar y poder ser infectante (Dunn, 1982; Cruz-Reyes, 1986; Soulsby, 1987; Kassai, 1998).

Las metacercarias son ingeridas por el hospedero definitivo junto con el alimento o el agua. El desenquistamiento de las metacercarias tiene lugar en dos fases: La

primera o de activación comienza en el rumen, en una atmósfera de anhídrido carbónico concentrado, bajo condiciones reductivas y a temperatura de 39°C. La segunda o emergencia tiene lugar en el duodeno, mas alla de la abertura del conducto biliar, donde la bilis provoca la emergencia activando las enzimas de la metacercaria, que provocan la apertura del orificio de emergencia del quiste. Las metacercarias se alimentan de la mucosa intestinal y después perforan rápidamente la pared intestinal. La mayoría de las duelas están en la cavidad peritoneal 24 horas después del desenquistamiento, desde allí emigran hacia el hígado. A las 90 horas posinfección comienza la penetración de la Cápsula de Glisson; en este momento las fasciolas tienen forma lanceolada y miden 1 – 2 mm. Tras un periodo de migración, alimentación y crecimiento rápido en el parénquima de aproximadamente 6 semanas, los parásitos se alojan finalmente en los conductos biliares a partir de los 40 días posinfección, aproximadamente donde alcanzan la madurez sexual. Las fasciolas se autofecundan. Los primeros huevos aparecen en las heces del hospedador a partir de 55 – 56 días desde la ingestión de las metacercarias (Rojo Vázquez, 1999).

Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*



= forma infectante
 = forma diagnóstica

Patogenia

La patogenicidad depende del número de metacercarias ingeridas y su infectividad. La infección se puede presentar en forma crónica y aguda. La forma crónica pocas veces llega a tener consecuencias fatales y se debe a la presencia de los parásitos adultos en los conductos biliares; el hígado presenta fibrosis y colangitis hiperplástica. En los bovinos se presenta calcifilaxis, es decir, calcificación de los conductos biliares. La forma aguda, que es casi exclusiva de los borregos, es causada por el tránsito sin rumbo de las fasciolas inmaduras por el hígado. La lesión característica es una hepatitis traumática (Dunn, 1982). Los signos clínicos que se presentan en la forma aguda son casi inaparentes. En animales muy afectados se puede observar depresión, anorexia, aislamiento, fatiga y ascitis. En la forma crónica se manifiesta la anemia, edema submandibular y en casos extremos la enfermedad degenera produciendo mortalidad (Bautista, 1997).

Profilaxis

La fasciolosis, por su amplia distribución entre los rumiantes domésticos y muchas especies silvestres es difícilmente erradicable, pero si puede controlarse, combinando los tratamientos antihelmínticos con medidas higiénicas y el control del pastoreo.

La profilaxis de la fasciolosis debería comprender la aplicación correcta e integrada de las siguientes medidas: eliminación de los parásitos de los hospedadores definitivos infectados, disminución de las posibilidades de infección y reducción del número de moluscos hospedadores intermediarios.

La forma mas importante y generalizada de profilaxis en todo el mundo es la aplicación estratégica de fasciolicidas que eliminan los parásitos de los animales

infectados y que también contribuye a la reducción de la contaminación de los pastos. La elección del fármaco, aparte de consideraciones económicas, debe basarse en el conocimiento de su eficacia frente a las diferentes fases del desarrollo de *F. hepatica*; y la epidemiología local, que nos permite conocer cuando es mayor el riesgo de infección. Para reducir las posibilidades de infección es necesario mantener alejado al ganado de los hábitat de los caracoles. El drenaje de las zonas encharcadas donde existen limneas quizá sea el método más eficaz a largo plazo, aunque es menos costoso el cercado de éstas. Las poblaciones de caracoles pueden reducirse con el uso de molusquicidas (niclosamida, pentaclorofenatosódico, N-tritil-morfolina), aunque su eficacia es variable dependiendo de las características del terreno y la época del año. Su utilidad en la práctica es discutible por el elevado potencial biótico de los caracoles y el impacto ambiental debe, también, tenerse en cuenta. La rotación de pastos o de hospedadores con el fin de reducir el riesgo de infección, también puede ser eficaz (Rojo Vázquez, 1999).

Datos epidemiológicos en México

En México se han realizado diversos estudios en los diferentes estados de la república en donde se encuentran prevalencias que van del 73 al 100% en Hidalgo (Ballesteros, 1995); Tabasco (Castro, 1983); Estado de México, Michoacán y Veracruz (Quiroz, 1973) y con prevalencias del 31 al 70% en Guanajuato, Tlaxcala, Morelos, Puebla, Jalisco, Durango, Aguascalientes, Oaxaca (Quiroz, 1987; Trejo *et al*, 1992; Valtierra *et al*, 1989; Campos *et al*, 1991). Las prevalencias más bajas en orden del 2 al 21.5% se han determinado en los estados de Sonora, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Tamaulipas, Zacatecas y San Luis Potosí (Pliego *et al*, 1993; Osegueda y Tavizon, 1983; García, 1989). Los estados de Baja California Sur, Yucatán y Quintana Roo se reportan como libres de esta enfermedad ya que las condiciones ecológicas no son favorables para su transmisión (Quiroz, 2000^b).

Impacto Económico de la Fasciolosis

La fasciolosis es considerada mundialmente como una de las enfermedades más importantes de los rumiantes domésticos. Se estima que 250 millones de borregos y 350 millones de bovinos, a nivel mundial, se encuentran afectados por *F. hepatica* (Hillyer, 1997). Boray (1985), estimó en 2,000 millones de dólares, el costo anual de pérdidas en el mundo por esta enfermedad.

Las pérdidas se subdividen en directas e indirectas

Las pérdidas directas se adjudican a las muertes de animales y decomiso del hígado cuando estos son sometidos a inspección en el rastro. Es pertinente notar que las ocasionadas por muerte se dan generalmente en ovinos debido a una alta ingestión de metacercarias (Ibarra *et al*, 2000^a).

Las pérdidas indirectas rebasan por mucho a las directas y estas consisten en disminución de peso, anemia progresiva, mala conversión alimenticia con el conocido síndrome de desnutrición, resequedad de la piel, mal estado de la carne, mala calidad de la lana, baja producción de la leche, entre 5 % en las vacas, y con fasciolosis crónica hasta el 70 ó 100 % en los animales que están parasitados. La infertilidad precoz y los abortos retardan el intervalo entre parto y parto, mal estado físico (caquéxico) como consecuencia bajo desarrollo de las crías, ya que retarda el crecimiento del 30 % hasta el 50% y mayor susceptibilidad a otras enfermedades infecciosas y parasitarias (Ibarra, 2000^a; Quiroz, 2000^a).

Datos conservadores obtenidos en México muestran que de 36 millones de bovinos, 18 millones están expuestos a la infección por *Fasciola*, esto debido a que esta cantidad de ganado se encuentra localizado en zonas reconocidas como "fasciolosas". Sin embargo, estudios epidemiológicos muestran que alrededor de 5

millones están realmente infectados y si reconocemos que cada animal pierde en su vida productiva 30 kg. de carne y a su vez multiplicamos estas pérdidas por \$30 pesos que actualmente cuesta cada kilo, se obtiene una pérdida global aproximada de \$ 4,500'000,000.00 (Ibarra *et al* , 2000^a).

Esto nos indica que se requieren entre 8 y 12 millones de dosis de fasciolida por año para tratar de controlar esta parasitosis (Ibarra *et al*, 2000^a).

En México se han realizado estudios que demuestran que la frecuencia de la fasciolosis va en aumento, por lo que el uso de fasciolidas se ha incrementado como alternativa de control. Sin embargo, todos ellos son de importación o si se producen en México es con materias primas traídas del extranjero.

Por otro lado, es importante hacer notar que desde hace 21 años no se han desarrollado nuevos fasciolidas y de hecho ya se reporta resistencia a alguno de estos fármacos, la cual disminuye la eficacia contra los diversos estadios del parásito.

II ANTECEDENTES

Antecedentes Quimioterapéuticos de fasciolidas

Los fasciolidas pertenecen a diversos grupos de acuerdo a su estructura y modo de acción. Tienen actividad variable contra el estado parasítico de *Fasciola hepatica* y marcadas diferencias en toxicidad. El entendimiento de estas características es importante para el uso seguro y efectivo de estos compuestos (McKellar and Kinabo, 1991).

millones están realmente infectados y si reconocemos que cada animal pierde en su vida productiva 30 kg. de carne y a su vez multiplicamos estas pérdidas por \$30 pesos que actualmente cuesta cada kilo, se obtiene una pérdida global aproximada de \$ 4,500'000,000.00 (Ibarra *et al* , 2000^a).

Esto nos indica que se requieren entre 8 y 12 millones de dosis de fasciolida por año para tratar de controlar esta parasitosis (Ibarra *et al*, 2000^a).

En México se han realizado estudios que demuestran que la frecuencia de la fasciolosis va en aumento, por lo que el uso de fasciolidas se ha incrementado como alternativa de control. Sin embargo, todos ellos son de importación o si se producen en México es con materias primas traídas del extranjero.

Por otro lado, es importante hacer notar que desde hace 21 años no se han desarrollado nuevos fasciolidas y de hecho ya se reporta resistencia a alguno de estos fármacos, la cual disminuye la eficacia contra los diversos estadios del parásito.

II ANTECEDENTES

Antecedentes Quimioterapéuticos de fasciolidas

Los fasciolidas pertenecen a diversos grupos de acuerdo a su estructura y modo de acción. Tienen actividad variable contra el estado parasítico de *Fasciola hepatica* y marcadas diferencias en toxicidad. El entendimiento de estas características es importante para el uso seguro y efectivo de estos compuestos (McKellar and Kinabo, 1991).

Los fasciolicidas actuales se ubican en cinco grupos químicos: (Fairweather and Boray, 1999).

- 1.-Fenoles halogenados: Bitionol (Bitin, Actamer), Hexaclorofeno (antiguamente Bilevón), Niclofolán (Bilevón), Nitroxinil (Trodax).
- 2.-Salicilanidas: Brotianide (Dirian), Closantel (Flukiver, Seponver, Supaverm, Cosicare), Oxiclozanida (Nilzan, Zaniil), Rafoxanide (Flukanide; Ranizol; Ranide).
- 3.-Bencimidazoles: Albendazol (Valbazen), Mebendazol (Telmin; Vermox; Supaverm), Triclabendazol Fasinex), Luxabendazol (Fluxacur).
- 4.- Sulfonamidas: Clorsulón (Curatrem, Ivomec F, Ivomec Plus).
- 5.- Fenoxialcanos: Diamfenetide (Coriban).

En el cuadro adjunto se muestran las principales características de los fasciolicidas indicados para bovinos en México.

Antihelmínticos bencimidazoles

Los bencimidazoles son un grupo ampliamente conocido de antihelmínticos de amplio espectro, los cuales tienen a nivel mundial un mercado de aproximadamente 300 millones de dólares anuales (Delatour y Parish, 1986). Son antiparasitarios de gran espectro poseen un buen margen de seguridad además de que son baratos. Se caracterizan por su efecto específico contra nematodos sobre todo gastrointestinales, pero algunos de ellos pueden abarcar en su espectro efectos cestodocidas, trematodocidas, larvicidas y ovicidas (Sumano y Ocampo, 1997).

Su mecanismo de acción varía dependiendo de la afinidad que estos manifiesten a su sitio de acción a nivel de los componentes del citoesqueleto de los parásitos, y en especial con la proteína tubulina, que a su vez se integra en las subunidades de los microtubulos. El medicamento evita la polimerización del microtubulo, comparandose la afinidad de estos compuestos a la tubulina de los mamíferos en relación con la afinidad correspondiente a la tubulina de los parásitos, demostrando baja toxicidad de estos productos para los mamíferos (Sumano y Ocampo, 1997).

Adicionalmente, los bencimidazoles inhiben el consumo de glucosa, incrementan el uso de las reservas de glucógeno e interactúan con las enzimas metabólicas de los parásitos, causando un efecto letal al producirse una disminución de adenosin trifosfato (ATP). De esta manera se ve afectada la supervivencia de los parásitos dentro del hospedero (Mckellar, 1990).

Estos antihelmínticos sufren un metabolismo extenso en los mamíferos después de ser administrados por vía oral. El compuesto precursor generalmente tiene una vida media corta y son sus metabolitos los que predominan en el plasma, los tejidos y en las excretas.

Poseen baja solubilidad en el agua y gran influencia en la absorción y por lo tanto en su eficacia.

Los metabolitos primarios generalmente se originan a partir de procesos de oxidación e hidrólisis, siendo estos más solubles que su precursor. La conjugación también se lleva a cabo y en algunos casos los metabolitos conjugados llegan a ser los productos predominantes.

Los metabolitos bencimidazólicos se encuentran tanto en la orina como en las heces. A los metabolitos localizados en heces se les atribuye una absorción limitada, aunque la excreción biliar puede contribuir a que esto suceda.

Los perfiles de los metabolitos de los bencimidazoles se ajustan a patrones similares entre las diferentes especies de mamíferos, sin embargo el porcentaje de cada uno de ellos puede variar sustancialmente.

Hasta la fecha se han llevado a cabo numerosos estudios sobre el metabolismo y excreción de los bencimidazoles. Sin embargo, estos procesos son complejos; por lo que las vías y productos de éstos permanecen aún sin definirse claramente (Gottscharl, 1990).

Estos compuestos presentan un mecanismo de acción similar. La discrepancia en cuanto a la eficacia de estos fármacos contra los distintos parásitos se debe probablemente a la diferencia en la biodisponibilidad de los mismos dentro del animal hospedero; siendo los más potentes aquellos que presentan las velocidades de absorción y eliminación más lentas.

Con referencia a bencimidazoles con acción fasciolicida, los más utilizados a nivel mundial son Albendazol, Netobimin, Albendazol sulfóxido y Triclabendazol siendo este último el que ha mostrado mayor eficacia contra todos los estados evolutivos

de *Fasciola*, aún cuando algunos autores al evaluar este compuesto señalan que no remueven al parásito en un 100% (Dorchies y Ducos de Lahitte, 1983; Ropic *et al*, 1998).

Antecedentes del compuesto Alfa

En México se tiene conocimiento de por lo menos 21 compuestos fasciolicidas que han estado disponibles en el mercado durante varios años, la mayoría de ellos con bajos índices de seguridad (Ibarra, 1991). Sin embargo, la fasciolosis no ha disminuido por lo que se manifiesta la necesidad de producir un compuesto fasciolicida que sea eficaz contra los estadios inmaduros tempranos, juveniles y adulto de *F. hepatica*, y pueda competir en el aspecto económico con los productos de importación.

Por otro lado, en el Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET), del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), se ha estado realizando el escrutinio *in vitro* e *in vivo* de compuestos de síntesis química (Ibarra *et al* 1995^a; Ibarra *et al*, 1995^b; Ibarra *et al* 1997^a).

Dichos compuestos fueron sintetizados en colaboración con profesores e investigadores del departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), con la finalidad de contar con una alternativa nacional para el tratamiento de la fasciolosis.

Como parte de un programa de síntesis de nuevos compuestos antihelmínticos y con el fin de obtener una mayor información acerca de los requerimientos estructurales para la actividad antihelmíntica, se sintetizó una serie de compuestos análogos al triclabendazol, entre ellos el 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol al cual se le denominó compuesto Alfa.

El diseño y síntesis de este compuesto fue publicado por Hernández *et al* (2002). Para ello se utilizó un modelo pronetalol el cual es un bloqueador adrenergico formado por remplazo del grupo 3,4-diclorofenil en dicloroisoproterenol (DCI) por el grupo 2 naftil. El DCI es también un bloqueador adrenergico con una actividad agonista estableciendo así el hecho de que el pronetalol es un bioisostero del DCI. El 5-cloro-2-metil-6-(1-naftiloxi)-1*H*-benzimidazol se obtuvo de un análogo del Triclabendazol. En este compuesto el grupo 1-naftil reemplazó al grupo 3,4-diclorofenil en el TCB un cambio en el cual es análogo hecho con pronetalol-DCI. La preparación de la secuencia de la síntesis se describe en 6 pasos: En un primer paso se substituyó la 4,5-dicloro-2-nitroanilina a una reacción de sustitución nucleofílica con el 1-naftol (2) bajo condiciones ya conocidas el éter obtenido (3) fue reducido con SnCl₂·2H₂O. La correspondiente *o*-fenilendiamina (4) formada, fue ciclocondensada con CS₂ en un solución de EtOH-KOH que lleva al 2-mercaptobenzimidazol (5). En el último paso, este fue monoalquilado con CH₃I en acetona con solución de KOH para alcanzar el título del compuesto (6).

El compuesto sintetizado fue purificado por recristalización determinando sus constantes físicas. La estructura del compuesto fue establecida por espectroscopia y datos espectrométricos.

Información Técnica

Propiedades químicas del compuesto Alfa

Polvo blanco cristalino con ligero olor característico

Peso molecular: 340.86 g/mol.

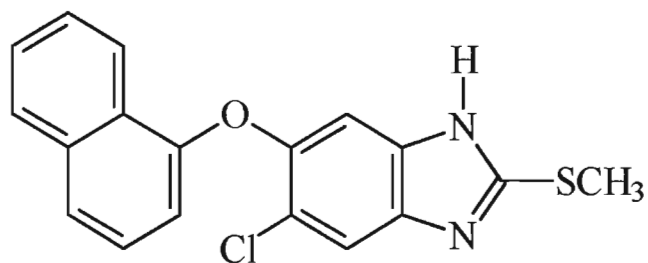
Punto de fusión: 171 – 179°C.

P_{ka}: 2.87⁹, compuesto con características de ácido débil.

Coefficiente de partición aparente octanol/agua: 27.63 (log P = 1.44)⁹

Fórmula condensada: C₁₈H₁₃ClN₂OS

Fórmula desarrollada:



5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol

Fig I. Estructura del compuesto Alfa

En el cuadro II se muestra la solubilidad del compuesto Alfa en diferentes pH y disolventes.

Cuadro II

Disolvente	Solubilidad (mg/ml)
Solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.4	> 0.00002
Solución amortiguadora de fosfatos pH = 6.0	0.00047
Solución amortiguadora de fosfatos pH = 2.2	0.0038
Solución amortiguadora de fosfatos pH = 1.3	0.0062
NaOH 0.1 N	0.00032
HCl 0.1N	0.01
Acetonitrilo	0.009
Acetona	0.038
Propilenglicol	0.041
Hexano	0.062
Metanol	0.1
Dimetil-sulfóxido	0.21

Estudios Toxicológicos

Con la finalidad de conocer la posible toxicidad del compuesto alfa en vacas gestantes, Ayala, (2002) realizó un experimento que se llevó a cabo en dos partes, en la primera se administró el compuesto a una dosis única de 12 mg/kg por vía oral cuando los animales cumplieron los 3, 6 y 9 meses de gestación correspondiéndole a cada periodo de gestación las letras B, C y D respectivamente. Se utilizaron 18 vacas, 12 de ellas en estado de gravidez, las cuales a su vez se dividieron en dos grupos de 6 animales cada uno, B1(gestante tratado) y B2 (gestante no tratado), las 6 vacas restantes B3 estaban vacías y quedaron como testigo blanco. El mismo procedimiento se siguió en los grupos C y D. En la segunda parte del estudio se utilizaron animales de inicio de gestación (45 a 60 días), se formaron 3 grupos de 6 animales c/u dividiéndose en A1 (gestantes tratadas), A2 (gestantes no tratadas) y A3 (testigo vacío blanco).

Con el fin de reforzar el estudio se tomaron muestras de sangre a todos los bovinos a las 0 y 36 horas postratamiento con el compuesto Alfa para realizar estudios hematológicos y de química sanguínea. También paralelamente se llevó un registro mensual de las constantes fisiológicas (temperatura, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y movimientos ruminales). Los resultados mostraron que el estado físico de las crías de las madres tratadas, no se observó ninguna malformación o conducta extraña con respecto a las crías de las vacas que no recibieron tratamiento. Por lo que se concluye que el compuesto Alfa administrado a la dosis 12 mg/kg *per os*, no induce alteración alguna en las vacas gestantes, ni en sus crías.

Modo de acción

Se realizó un estudio con la finalidad de determinar mediante microscopía electrónica de barrido los cambios estructurales en el tegumento de fasciolas

adultas después del tratamiento con el compuesto Alfa *in vivo* (12 mg/kg per os) y su metabolito sulfóxido *in vitro* (40 mg/lit). Los resultados de ambos estudios mostraron a las 6 horas postratamiento un engrosamiento del tegumento, surcos y lesiones en las espinas. A las 12 horas los surcos se observaron más profundos y las espinas estaban rodeadas por el tegumento. 24 horas postratamiento el tegumento en algunas áreas se observaba con ausencia de espinas y con la lámina basal expuesta, siendo más severos a medida de que los periodos de incubación de las fasciolas tratadas fueron más largos, por lo cual el trabajo concluye que el compuesto Alfa ejerce un efecto importante sobre el tegumento de *Fasciola hepatica* (Rivera *et al*, 2004).

Posteriormente Mc Conville (2004) realizó un estudio morfológico del tegumento de fasciolas resistentes a triclabendazol, para determinar los efectos del compuesto Alfa *in vivo* (10mg/kg) a 24 y 48 h. y su metabolito sulfóxido (10ug/ml) por 24 horas. Los cambios morfológicos del tegumento interno y de la superficie se examinaron por medio de microscopía electrónica de barrido y de transmisión, demostrando rompimiento del tegumento de las fasciolas después de 24 h. del tratamiento *in vitro* y entre 24 y 48 h del tratamiento *in vivo*. Enfatiza la relevancia de estos resultados en virtud de demostrar una alta actividad fasciolicida del compuesto Alfa contra un aislado de *F. hepatica* resistente a triclabendazol. Asimismo la autora señala al compuesto alfa como una posible estrategia potencial para atacar los problemas actuales de resistencia a antihelmínticos fasciolicidas.

Estudios Farmacocinéticos

Ovinos.- Se desarrolló un método analítico por cromatografía de líquidos para la determinación del compuesto Alfa y su metabolito sulfóxido en plasma y orina de ovinos. Una vez probado el método como adecuado y confiable para cuantificar fluidos biológicos, se administró el compuesto Alfa a dosis de 12 mg/kg por vía

oral a 7 ovinos de raza pelibuey tomando muestras sanguíneas a las 0 (blanco), 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 30, 36, 48, 72, 96, 102, 144 y 168 horas postratamiento. Se observó que el compuesto alfa sufre efecto de primer paso metabolizándose a sulfóxido teniendo una vida media de absorción de 6.17 horas, vida media de eliminación de 18.95 horas, concentración plasmática máxima de 8.0 $\mu\text{g/ml}$, tiempo para llegar a la concentración plasmática máxima de 11.4 horas, una área bajo la curva de 238.39 $\mu\text{g h/ml}$, un volumen de distribución de 59.57 L y una depuración de 68.76 ml/min. (Del Rivero, 1998).

Bovinos.- Se evaluaron los parámetros farmacocinéticos administrando a 7 bovinos criollos una dosis oral de 12 mg/kg de peso, tomando muestras plasmáticas de la vena yugular a intervalos de tiempos estandarizados.

La farmacocinética de los metabolitos sulfóxido y sulfona se describió de acuerdo a un Modelo Abierto de Un Compartimiento (MAUC) las vidas medias de aparición obtenidas para el sulfóxido y para la sulfona fueron de 9.43 ± 5.10 horas y 26.26 ± 2.73 horas, respectivamente.

La vida media de eliminación del sulfóxido se calculó en 25.82 ± 2.35 horas y para la sulfona de 34.79 ± 8.36 horas.

El tiempo medio de residencia (TMR) del sulfóxido fue de 56.45 ± 2.40 horas y de la sulfona fue de 91.54 ± 10.57 horas lo cual indica que estos metabolitos están presentes en el organismo por un tiempo prolongado (Vertiz, 2000).

Estudios Quimioterapéuticos

De la selección *in vitro* de estos compuestos previamente sintetizados, surgieron dos productos con excelente eficacia, que motivaron a llevar su evaluación biológica *in vivo*, en ovinos infectados experimentalmente con *F hepatica*, uno el 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol, compuesto Alfa y dos el 5-cloro-6-(2-

naftoxi)-2-metiltiobencimidazol, llamado compuesto Beta. Cada producto fue probado a las dosis de 10 y 15 mg/kg por vía oral obteniendo un porcentaje de eficacia de 80.6 y 86.9 y 0.0 y 0.0 para ambos compuestos respectivamente (García, 1993).

En otro estudio y con la idea de corroborar la eficacia conferida por el compuesto Alfa, se utilizaron 50 ovinos que contenían una infección experimental con fasciolas de 4 y 10 semanas de edad. Los animales se dividieron en 5 grupos de 10 borregos cada uno. Los grupos 1 al 4 fueron tratados con el compuesto a una dosis oral de 10, 15, 22 y 30 mg/kg, respectivamente, dejando al grupo 5 como testigo, sin tratamiento. La eficacia se midió como porcentaje de reducción de fasciolas en los grupos tratados con respecto al testigo obteniendo 82.2%, 87.2%, 90.8% y 94.3% contra fasciolas de 4 semanas de edad y de 81.7%, 88.1%, 87.2% y 90.0% contra fasciolas de 10 semanas de edad respectivamente (Ibarra *et al* 1997b).

De manera general, se observó que en los estudios anteriormente mencionados, posiblemente la variabilidad de eficacia de los compuestos evaluados podía atribuirse, en parte, a que los fármacos utilizados no se administraban mediante un buen vehículo que transportara al compuesto Alfa en mayores porcentajes, que contribuyeran a obtener una mejor absorción y biodisponibilidad.

En virtud de que en previos estudios el compuesto Alfa fue administrado utilizando una suspensión de dimetilsulfóxido al 5% en agua, se realizó otro estudio en borregos con la finalidad de seleccionar un vehículo adecuado para formular al compuesto. Para ello se utilizaron 25 ovinos infectados artificialmente con 200 metacercarias del parásito y se dividieron en 5 grupos de 5 animales cada uno. Los grupos 1 al 4 se trataron con el compuesto Alfa a dosis de 15mg/Kg formulado en diferentes vehículos, y el grupo 5 quedó como testigo sin tratamiento. Los resultados mostraron una eficacia de 100, 100, 92.4, y 77% para

fasciolas adultas de 10 semanas y de 100% contra fasciolas juveniles de 4 semanas de edad, mostrando con esto una mejoría aceptable en la formulación del fármaco (Ibarra *et al*, 2000^b).

En otro estudio, se utilizaron 60 ovinos de raza pelibuey libres de infección por *F. hepatica*, para evaluar la eficacia del compuesto Alfa contra fasciolas de 3 días, 2, 4, 6, 8 y 10 semanas de edad. En el día 0 todos los animales fueron infectados por vía oral con 150 metacercarias, se formaron 12 grupos de 5 animales cada uno. Los grupos 1, 3, 5, 7, 9 y 11 se trataron con el compuesto Alfa a una dosis de 15 mg/kg vía oral a los 3 días, 2, 4, 6, 8 y 10 semanas posinfección respectivamente. Los grupos 2, 4, 6, 8, 10 y 12 fueron testigo sin tratamiento. Los animales se sacrificaron 4 semanas posteriores al tratamiento, colectando el hígado para el conteo de fasciolas presentes en este. La eficacia se midió con el número de trematodos presentes en los grupos tratados con respecto al número de parásitos del grupo testigo. Los resultados mostraron una eficacia del 100% en todos los grupos tratados. Los grupos testigo tuvieron un promedio de 189 fasciolas a la necropsia. Se concluye que el compuesto Alfa mostró una eficacia altamente aceptable contra fasciolas de diversas edades en ovinos (Rivera *et al*, 2002).

Posterior a las diversas experiencias con el compuesto Alfa obtenidas en ovinos, se decidió realizar un estudio en bovinos infectados en forma natural, el cual consistió en determinar el porcentaje de reducción de huevos de *F. hepatica* a los 14 y 21 días postratamiento en grupos tratados con respecto al testigo sin tratamiento. Para ello se utilizaron 40 bovinos adultos de raza Holstein Friesian previamente determinados como positivos a huevos de párasito mediante la técnica de sedimentación. Los animales se dividieron en 4 grupos de 10 animales cada uno. El grupo 1 recibió el compuesto Alfa a una dosis oral de 12 mg/kg, el grupo 2, Triclabendazol a una dosis oral de 12 mg/kg (Fasinex-Ciba Geigy). El grupo 3 Closantel a 5 mg/Kg por vía subcutánea (Flukiver-Roussel). El grupo 4

fungió como testigo sin tratamiento. Los porcentajes de eficacia obtenidos fueron de 90.1% y 85.3% para el compuesto alfa, 91.5% y 96.5% para el triclabendazol, y 82.1% y 92.1%, para closantel (Ibarra *et al*, 2002).

Esto nos hace pensar que el compuesto Alfa ofrece un potencial altamente promisorio para controlar y eliminar infecciones por fasciolas adultas y juvenes.

Como la mayoría de estudios han sido llevados a cabo en ovinos, se requiere evaluar la eficacia del compuesto alfa en bovinos, ya que como anteriormente se mencionó la población bovina rebasa por mucho al número de ovinos existente en nuestro país.

El presente proyecto de Tesis Doctoral tuvo como finalidad realizar 6 estudios encaminados a dilucidar diversos parámetros requeridos para conocer la eficacia y seguridad del compuesto en estudio en bovinos.

III OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficacia fasciolicida del compuesto "Alfa" en bovinos con infección natural y artificial, y determinar la tolerancia al fármaco por parte del animal para obtener índice de seguridad y coeficiente de eliminación del compuesto en leche.

IV OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Determinar la dosis efectiva del compuesto alfa en bovinos infectados en forma experimental y natural.

fungió como testigo sin tratamiento. Los porcentajes de eficacia obtenidos fueron de 90.1% y 85.3% para el compuesto alfa, 91.5% y 96.5% para el triclabendazol, y 82.1% y 92.1%, para closantel (Ibarra *et al*, 2002).

Esto nos hace pensar que el compuesto Alfa ofrece un potencial altamente promisorio para controlar y eliminar infecciones por fasciolas adultas y juvenes.

Como la mayoría de estudios han sido llevados a cabo en ovinos, se requiere evaluar la eficacia del compuesto alfa en bovinos, ya que como anteriormente se mencionó la población bovina rebasa por mucho al número de ovinos existente en nuestro país.

El presente proyecto de Tesis Doctoral tuvo como finalidad realizar 6 estudios encaminados a dilucidar diversos parámetros requeridos para conocer la eficacia y seguridad del compuesto en estudio en bovinos.

III OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficacia fasciolicida del compuesto "Alfa" en bovinos con infección natural y artificial, y determinar la tolerancia al fármaco por parte del animal para obtener índice de seguridad y coeficiente de eliminación del compuesto en leche.

IV OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Determinar la dosis efectiva del compuesto alfa en bovinos infectados en forma experimental y natural.

- 2.- Evaluar la eficacia fasciolicida del 6-cloro-2-metiltio-5-(1-naftiloxi) bencimidazol contra fasciolas de 4 y 10 semanas de edad en bovinos infectados en forma experimental.
- 3.- Evaluar la eficacia fasciolicida del 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)1H bencimidazol (compuesto alfa) contra fasciolas de 3 días, 2, 3, 4, 6, 8, 10 y 12 semanas de edad en vaquillas infectadas experimentalmente.
- 4.- Determinar la Máxima Dosis Tolerada (MDT) y el Índice de Seguridad (IS) del compuesto alfa en bovinos.
- 5.- Determinar la eficacia del compuesto ALFA, comparado con tres fasciolicidas comerciales a través del porcentaje de reducción de huevos de *F. hepatica* en bovinos infectados en forma natural.
- 6.- Determinar mediante un ensayo cromatografico la permanencia de residuos en leche de bovinos.

V REFERENCIAS

- Ayala Arzaluz Serafín Evaluación toxicológica del compuesto fasciolicida alfa en vacas gestantes. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. 2003.
- Ballesteros RG, Guerrero MC, Vega AN, Quiroz RH. Valoración del control de *Fasciola hepatica* en vacas tratadas con triclabendazol. Memorias del XIX Congreso Nacional de Buiatria. Torreón, Coahuila. Del 24 al 26 de agosto de 1995; pag 150.
- Bautista. GR. Respuesta inmune en fasciolosis de los rumiantes. Enfermedades helmínticas de importancia sanitaria y económica. Curso Internacional. Fac. Med. Vet. Y Zoot. UNAM. 1997; pag 32-38.
- Boray JC, Jackson R, Strong MV. Chemotherapy of fasciolosis with triclabendazole. New. Zealand Vet. J. 1985; 33: 182-185.

VI. Experimento 1

DETERMINACIÓN DE LA DOSIS EFECTIVA DE UN FASCIOLICIDA EXPERIMENTAL EN GANADO INFECTADO EN FORMA NATURAL Y EXPERIMENTAL

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue el de determinar la dosis efectiva de un fasciolicida experimental llamado compuesto Alfa o 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol en bovinos infectados en forma natural y experimental. En un primer experimento se utilizaron 24 toretes libres de la infección por *Fasciola* los cuales fueron infectados cada uno con 800 metacercarias de *Fasciola hepatica* y reinfectados en el día 45 con otros 600 quistes por animal. En el día 75, cuando los animales tenían fasciolas entre 4 y 10 semanas de edad respectivamente, estos fueron divididos en 4 grupos (G) de 6 animales cada uno de acuerdo a los conteos de huevos de *Fasciola*. Los grupos 1 al 3 recibieron el compuesto Alfa a dosis de 10, 12 y 14 mg/kg/ per os; respectivamente. El G4 permaneció como control sin tratamiento. A los 20 días posteriores al tratamiento los animales fueron sacrificados para coleccionar las fasciolas presentes. La eficacia fue medida como porcentaje de reducción de huevos o fasciolas con relación al grupo sin tratamiento. En un segundo experimento, se utilizaron 24 novillos positivos a huevos de *Fasciola* los cuales tenían una infección en forma natural. Estos fueron divididos en 4 grupos de 5 animales cada uno. Los grupos 1 al 3 recibieron el compuesto Alfa a dosis de 10, 12 y 14 mg/kg/po; respectivamente. El grupo 4 sirvió como control sin tratamiento. Todos los procedimientos para determinar eficacia se llevaron a cabo tal y como se mencionó en el primer experimento. Los resultados en el primer estudio mostraron un porcentaje de reducción de huevos de 97.3, 100 y 100 y el promedio general de reducción de

fasciolas fue de 94.3, 100 y 100 para los grupos 1 al 3 respectivamente. En el segundo estudio, el porcentaje de reducción de huevos fue 87.5, 99.1 y 100 y la eficacia promedio de reducción de fasciolas fue 84.2, 99.6 y 100 para los grupos 1 al 3 respectivamente. Se concluye que la dosis efectiva seleccionada para el compuesto alfa fue de 12 mg/kg/p.o. en ganado que tenía una infección inducida o natural por *Fasciola hepatica*.

INTRODUCCIÓN

Durante algunos años se ha realizado el escrutinio *in vitro* e *in vivo* de compuestos en búsqueda de eficacia fasciolicida. Como se ha mencionado anteriormente, el compuesto Alfa (Hernández et al 2002), ha mostrado altos porcentajes de eficacia en ovinos y bovinos infectados en forma experimental. (Ibarra *et al*, 1997^{a, b}, 2000; Vera *et al*, 2001, 2003, 2004).

Un punto relevante de hacer notar es que la mayoría de estudios realizados con este compuesto han sido evaluados en ovinos. Sin embargo, la población de ganado en México rebasa por mucho a la población ovina, razón por la que se manifiesta relevante determinar la actividad de este compuesto en bovinos. Uno de los estudios importantes de realizar es el de determinar la dosis efectiva o dosis clínica recomendada para continuar con las subsiguientes evaluaciones utilizando esta dosis seleccionada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Primer experimento (toretos infectados experimentalmente).

Animales.- Se utilizaron 24 toretes, machos cruzados de aproximadamente 4 años de edad, los cuales estaban localizados en un área libre de fasciola ubicada en el rancho GB del INIFAP de Querétaro, Qro.

Infecciones.- En el día 0 los animales fueron infectados con 800 metacercarias de *Fasciola hepatica* y posteriormente recibieron una segunda infección en el día 45 con 600 metacercarias por animal, las cuales se dosificaron en cápsulas de gelatina por vía oral. Las metacercarias se produjeron a partir de caracoles *Lymnaea cubensis* infectados en el laboratorio con miracidios provenientes de huevos colectados de vesículas biliares de bovinos sacrificados en el rastro de Toluca, Edo. de México.

Conducción del experimento.- En el día 75 los animales fueron divididos en 4 grupos (G) de 6 animales cada uno, todos ellos seleccionados en orden descendiente tomando como base los conteos de huevos de fasciola de las muestras de heces tomadas en el día 67 (Maff, 1988).

Tratamientos.- En el día 75, los grupos 1 al 3 recibieron al compuesto Alfa en dosis de 10, 12 y 14 mg/kg/p.o; formulado como suspensión al 10% respectivamente. El grupo 4 permaneció como testigo sin tratamiento.

Evaluaciones.- A los 16 días posteriores al tratamiento, los toretes fueron sacrificados en el rastro local y los hígados fueron disectados para colectar las fasciolas presentes tal y como lo describe Wood *et al*, (1995). Los hígados fueron cortados en trozos de aproximadamente 1 cm. de grosor y puestos en solución salina para estimular la salida de los parásitos de los conductos biliares durante aproximadamente 30 min.

Para estimar la edad de las fasciolas se midieron los parásitos intactos y estos fueron examinados microscópicamente para determinar la presencia de huevos en el útero. Los vermes recuperados fueron medidos y clasificados ya sea como inmaduros (4 semanas de edad) o fasciolas adultas (10 semanas de edad).

La eficacia fue medida de acuerdo a la fórmula descrita por Foreyt (1988) y Eckert et al. (1984):

$$\% \text{ Eficacia} = \frac{\text{Número promedio de huevos o fasciolas en el grupo testigo} - \text{Número promedio de huevos o fasciolas en los grupos tratados}}{\text{Número promedio de huevos o fasciolas en el grupo testigo}} \times 100$$

Análisis estadístico.- Se realizaron comparaciones de los promedios de tratamiento y los números totales de fasciolas colectadas los cuales fueron sometidos a la prueba de Kruskall Wallis para determinar posibles diferencias estadísticas en la reducción de huevos o fasciolas (Zar, 1996). Todos los análisis fueron llevados a cabo utilizando el paquete estadístico SAS (1990).

Segundo experimento (novillos infectados en forma natural)

Localización del estudio.- El estudio fue llevado a cabo en el rancho el Cocal, localizado en el municipio de Martínez de la Torre, Veracruz.

Animales.- Se utilizaron 20 novillos cruzados entre 3 y 4 años de edad los cuales se encontraban infectados en forma natural con *Fasciola hepatica*. Estos fueron incluidos una vez que fueron determinados como positivos a la presencia de huevos de fasciola mediante las pruebas de sedimentación y de anticuerpos anti-*F hepatica* mediante la prueba de ELISA indirecta (Ibarra et al, 1998). Los bovinos se dividieron en 4 grupos de 5 animales cada uno de acuerdo al orden descendente de su número de huevos.

Tratamientos.- Los grupos 1, 2 y 3 recibieron al compuesto por vía oral a dosis de 10, 12 y 14 mg/kg de peso corporal respectivamente. El grupo 4 sirvió como testigo sin tratamiento.

Evaluaciones.- A los 30 días después del tratamiento los animales fueron sacrificados y todos los procedimientos se llevaron a cabo tal y como se mencionó en el experimento 1.

RESULTADOS

Primer experimento (toretos infectados experimentalmente)

Los resultados obtenidos con respecto a la reducción de huevos de fasciolas mostraron un alto decremento de huevos en el día de sacrificio. La reducción de huevos se mostró a muy alto nivel siendo de 97.3, 100 y 100% para los grupos 1, 2 y 3 respectivamente (Cuadro 1.1). No se observaron diferencias estadísticas entre los grupos tratados.

El Cuadro 1.1 también muestra la recuperación de fasciolas adultas e inmaduras posterior al tratamiento con el compuesto Alfa. El número promedio de fasciolas para el grupo 1 fue de 1.5 adultas y 7.6 inmaduras. No se obtuvieron fasciolas en los grupos 2 y 3. El porcentaje de eficacia para fasciolas adultas fue 98.8, 100 y 100 y para fasciolas inmaduras de 90.9, 100 y 100, para los grupos 1, 2 y 3 respectivamente.

El grupo testigo tuvo un promedio de 187 fasciolas por animal y un promedio de 102 adultas y 85 fasciolas inmaduras por animal. El análisis estadístico indicó diferencias en el grupo 1 cuando se comparó con los grupos 2 y 3 ($P < 0.05$).

La Figura 1.1 muestra el rango de distribución (talla) en el cual 312 fasciolas se ubicaron en el rango entre 5.1 y 10 mm y otro grupo grande de 286 fasciolas que midieron entre 15.1 y 20.0 mm.

De manera general se encontraron fasciolas desde 3.0 hasta 30 mm en longitud.

Segundo experimento (novillos infectados en forma natural)

El Cuadro 1.2 muestra la reducción de huevos en el cual se observaron muy pocos de estos en el grupo 1 y aun en menor número en el grupo 2. Asimismo, no se encontraron huevos en el grupo 3, cuando se compararon contra el día 0. El porcentaje de reducción de huevos obtenidos para los grupos 1, 2 y 3 fue de 87.5, 99.1 y 100, respectivamente. El testigo sin tratamiento siempre permaneció con el número mayor de huevos de fasciola. Se observaron diferencias estadísticas en el grupo 1 cuando se comparó con los grupos 2 y 3 ($P < 0.05$).

El Cuadro 1.2 muestra un promedio de 7.6 adultos y 2.2 fasciolas inmaduras colectadas del grupo 1, solo una fasciola en el grupo 2, no encontrando fasciolas en el grupo 3, lo cual corresponde a un porcentaje de reducción de fasciolas de 83.4, 100 y 100 para adultas y 86.7, 98.7 y 100 para fasciolas inmaduras, respectivamente. El grupo testigo sin tratamiento tuvo un promedio de 62.4 fasciolas por animal y una media de 45.8 adultos y 16.6 fasciolas inmaduras por animal. Las comparaciones que se llevaron a cabo entre los grupos mostraron una diferencia estadística en el grupo 1 cuando se comparó con los otros grupos ($P < 0.051$).

La Figura 1.2 muestra la talla de distribución en la cual 85 fasciolas se ubicaron en el rango de 15.1 y 20 mm y otro grupo grande de 81 fasciolas las cuales se encontraron en el rango entre 20.1 y 25.0 mm. Las fasciolas midieron de manera general entre 1.0 a 30 mm en longitud.

DISCUSIÓN

Primer experimento

Aún cuando la eficacia ejercida por el compuesto Alfa ya sea en reducción de huevos o fasciolas en ambos experimentos fue a muy alto nivel en los grupos 2 y 3, se observó cierta debilidad del compuesto al observar los datos del grupo 1.

El compuesto experimental mostró ligera pero mayor capacidad al remover estados adultos, mostrando ser altamente aceptable al hacer comparaciones con otros fasciolicidas comerciales cuyo rango de actividad se reporta ser menor (Richards et al, 1990; Boray , 1986; Shin-Sung et al, 1995; Ibarra et al, 2001).

Segundo experimento

El patrón de infecciones en los novillos fue diferente considerando que ellos tenían una infección natural de fasciola. Las infecciones tuvieron de todas las edades del parásito incluyendo fasciolas menores a 6 semanas de edad. Las fasciolas recuperadas de los animales sacrificados se mantuvieron en un rango de longitud entre 1.0 a 30.0 mm. De acuerdo a Boray et al, (1967) se considera que las fasciolas que miden entre 10.2 y 13.2 mm a la hora del tendrían a la hora del tratamiento una edad aproximada entre 1 día y 3 semanas de edad. Las fasciolas mas grandes no pueden ser categorizadas como maduras ya que se hace imposible establecer cuantas de ellas podrían haber sido inmaduras o ya adultas al tiempo de tratamiento; sin embargo contra este rango de fasciolas de diferentes edades el compuesto Alfa mostró alta eficacia. Importante de notar es que el compuesto Alfa sobrepasa la falta de actividad mostrada contra estadios inmaduros de los viejos fasciolicidas tales como el meniclofolan, nitroxinil, rafoxanide, albendazol, closantel y clorsulón entre otros (Cordero del Campillo y Rojo Vázquez, 1999).

Por otro lado el triclabendazol (TCBZ) ha sido utilizado ampliamente para controlar fasciolosis en virtud de su excelente eficacia contra estadios inmaduros. Sin embargo, el problema de resistencia contra fasciolas adultas ha sido confirmado en ovinos de Australia (Overend y Bowe, 1995), en ovinos de Escocia (Mitchell et al, 1998), en una prueba controlada con un aislado en el condado de Sligo en Irlanda (Coles et al, 2000). En el sur de Gales, Thomas *et al* (2000) trató un grupo de borregas con un producto que contenía tricabendazol y levamisol y 5 de 9 muestras fecales examinadas en el laboratorio contenían huevos de fasciola. Todos los animales fueron tratados entonces con closantel (Flukiver; Janseen-Animal Health) y 7 días más tarde no se observaron huevos a la examinación coprológica. Moll *et al*, (2000) trataron ovinos y bovinos con TCBZ en una granja en el norte de Holanda. Los análisis de heces postratamiento mostraron un alto número de huevos de fasciola produciendo bajos niveles de eficacia. Sus resultados fueron altamente indicativos de la presencia de resistencia al TCBZ contra *Fasciola hepatica* en ovinos y bovinos de ésta granja. Gaasenbeek et al, (2001) en un estudio llevado a cabo en ovinos, comparó la eficacia del TCBZ contra una cepa resistente de *Fasciola hepatica* contra una cepa susceptible de laboratorio. Sus resultados mostraron eficacia de 10.8% en la cepa resistente y 99.8% en la cepa susceptible.

Asimismo, Fairweather *et al*, de la Universidad de Belfast (comunicación personal) llevó a cabo un experimento inicial con el compuesto Alfa contra fasciolas resistentes al TCBZ. Este fue un experimento *in vitro* para obtener algunos datos de microscopía electrónica de barrido en el cual las fasciolas se encontraban inactivas “muertas” dentro de las siguientes 24 horas, en comparación a un experimento por separado en el cual se utilizó el sulfóxido del TCBZ y un aislado susceptible al TCBZ, encontrando que las fasciolas se movían todavía después de las 24 horas.

Posteriormente Mc Conville (2004) continua estos estudios utilizando el metabolito sulfóxido del compuesto Alfa a 10 ug/ml contra fasciolas resistentes al triclabendazol bajo condiciones *in vitro* e *in vivo* en este último se llevo a cabo usando una dosis de 10 ug/ml del compuesto a 24 y 48 hrs en ratas, evaluando con un estudio morfológico sobre los cambios que se suceden en el tegumento de fasciola utilizando microscopia de barrido y de transmisión. Sus resultados indicaron un rompimiento de fasciolas a las 24 horas postratamiento indicando que los hallazgos encontrados son de relevancia en virtud de la capacidad del compuesto Alfa para destruir aislados de fasciolas resistentes al triclabendazol. Por lo tanto se deben realizar otras investigaciones encaminadas a probar la eficacia del compuesto Alfa contra cepas de fasciolas resistentes.

Se concluye que la dosis efectiva seleccionada para el compuesto Alfa fue de 12 mg/kg/po en bovinos que contenían una infección inducida o natural por *Fasciola hepatica*.

REFERENCIAS

- Boray JC, Happich FA, Andrews JC. Comparative Chemotherapeutical Tests in Sheep Infected with Immature and Mature *Fasciola hepatica*. Vet Rec 1967; 80: 218-224.
- Boray JC. Trematode infections of domestic animals. In: Campbell W C & Rew RS, editors. Chemotherapy of parasitic diseases. New York: Plenum Press, 1986: 401-425.
- Coles GC, Rhodes AC, Stafford KA. Activity of closantel against triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. Vet Rec 2000; 146: 504.
- Eckert J, Schneiter G, Wolf K. Fasinex (Triclabendazole)-ein neues Fazciolizide. Berl. Munch. Tierarztl. Wochr.1984; 91: 249-356.

- Foreyt WJ. Efficacy of a Fenbendazole-Triclabendazole Combination against *Fasciola hepatica* and Gastrointestinal Nematodes in Sheep. *Vet Parasitol* 1988; 26: 265-271.
- Gaasenbeek CPH, Moll L, Cornelissen PJBW, Vellema P, Borgsteede FHM. An experimental study on triclabendazole resistance of *Fasciola hepatica* in sheep. *Vet Parasitol* 2001; 95: 37-43.
- Hernández CA, Ibarra VF, Vera MY, Rivera FN, Castillo BR. Synthesis and Fasciolicidal activity of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthiloxy)-1H-benzimidazole. *Chem Pharm Bull* 2002; 50: 649-652.
- Ibarra VF, García SE, Fernández RM, Vera MY, Castillo BR, Hernández CA. Eficacia de dos compuestos de síntesis química *in vivo* e *in vitro* en ovinos. *Vet Méx* 1997^a; 28: 291-296.
- Ibarra VF, Vera MY, Hernández CA, Castillo BR. Eficacia fasciolicida del compuesto ALFA contra estadios juveniles y adultos en ovinos. *Vet. Méx* 1997^b; 28: 297-301.
- Ibarra F, Montenegro N, Vera Y, Boulard C, Quiroz H, Flores J, Ochoa P. Comparison of three ELISA tests for seroepidemiology of bovine fasciolosis. *Vet Parasitol* 1998; 77: 229-236.
- Ibarra VF, Montenegro CN, Flores CJ, Hernández CA, Castillo BR. Evaluación de cuatro vehículos para formular un fasciolicida experimental. *Vet Méx* 2000; 31: 47-51.
- Ibarra Velarde F, Vera Montenegro Y, Nájera Fuentes R, Sánchez Albarrán A. Efficacy of combined chemotherapy against gastrointestinal nematodes and *Fasciola hepatica* in cattle. *Vet Parasitol* 2001; 99: 199-204.
- McConville Maeve. Evaluation of a novel benzimidazole compound against triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. Bachelor of Science (Honours) Degree. Biological Science. School of Biology and Biochemistry. The Queen's University of Belfast. 2004.

- Ministry of Agriculture Fisheries and Food. (MAFF). Manual of Veterinary parasitological laboratory techniques. Ref. book. 418. Third Ed. London. 1988.
- Mitchell GBB, Maris L, Bonniwell MA. Triclabendazole-resistance liver fluke in Scottish sheep. *Vet Rec* 1998;143: 399-403.
- Moll L, Gaasenbeek CPH, Vellema P, Borgsteede FHM. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in the Netherlands. *Vet Parasitol* 2000; 91: 153-158.
- Overend DJ, Bowen FL. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Aust Vet J* 1995;72: 275-276.
- Richards RJ, Bowen FI, Essenwein F, Teiger RF, Buscher G. The efficacy of triclabendazole and other anthelmintics against *Fasciola hepatica* in controlled studies in cattle. *Vet Rec* 1990; 126: 213-216.
- Rojo Vázquez FA, Ferre Pérez I. Fasciolosis. In: Cordero del Campillo M, Rojo Vázquez FA, editors. *Parasitología Veterinaria*. Madrid, España: Mc Graw-Hill-Interamericana, 1999; 260-272.
- Shin-Sung S, Lee-Chung G, Cho-Shinn H, Kim-Jong T, Wee-Sung, Shin S. Efficacy of closantel for the treatment of naturally-acquired and experimentally induced *Fasciola hepatica* infections in cattle. *Korean J Vet Res* 1995; 35: 347-352.
- Statistical Analysis Systems (SAS). Institute Inc.:SAS/STAT. User's guide: 4th ed. Cary (NC).1990.
- Thomas I, Coles GC, Duffus K. Triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica* in southwest Wales. *Vet Rec* 2000; 146: 200-203.
- Vera MY, Ibarra VF, Quiroz RH, Rios UA, Castillo BR, Hernández CA. Eficacia del 6-cloro-2-metil-tio-5-(1-naftiloxi) bencimidazol contra *Fasciola hepatica* de cuatro y diez semanas de edad en bovinos de México. *Vet Méx* 2001; 32: 77-80.
- Vera Montenegro Y, Ibarra Velarde F, Quiroz Romero H, Hernández Campos A, Castillo R. Field trial on the efficacy of an experimental fasciolicide compared

with some commercial compounds in naturally infected cattle. *Parasitol Res* 2003;91: 1-4.

Vera Montenegro Y, Ibarra Velarde F, Liébano Hernández E, Quiroz Romero H, Castillo Bocanegra R, Hernández Campos A, Ochoa Galván P. Efficacy of an experimental fasciolicide against immature and mature *Fasciola hepatica* in artificially infected. *Parasitol Res* 2004; 92: 211-214.

Vertiz Serrano Guadalupe. Evaluación farmacocinética de α -biof10 en ganado vacuno. (Tesis de Maestría en Farmacia). Facultad de Química, México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. 2000.

Wood IB, Amaral NK, Bairden K, Duncan JL, Kassai J, Malone JB, Pankavich JA, Reinecke RK, Slocombe O. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants. *Vet Parasitol* 1995;58: 181-213.

Zar JH (Ed.), 1996. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, NJ, 620 pp.

Cuadro 1.1 Eficacia del compuesto Alfa contra *Fasciola hepatica* inmaduras y adultas en toretes infectados en forma experimental

Grupo	Dosis (n=5) mg/kg/p.o.	Fasciolas recuperadas			% Eficacia			
		Adultas (media ± EE*, rango)	Inmaduras (media ± EE, rango)	Total (x) ± EE (rango)	reducción de huevos	reducción de fasciolas		
1	10	1.5a,b ± 0.7 (0 - 4)	7.6a,b ± 3.7(0 - 24)	8.8a,b ± 3.8 (0 - 24)	97.3a	98.8	90.9	94.3
2	12	0a ± 0	0a ± 0	0a	100a	100	100	100
3	14	0a ± 0	0a ± 0	0a	100a	100	100	100
4	Testigo	102b ± 10.7 (76 -141)	85b ± 5.6 (66 -106)	187b ± 13.2 (158 -247)	-----	-----	-----	-----

* Error estandar

a,b, Diferente letra en la misma columna indica diferencias estadísticas (P<0.051).

Cuadro 1.2 Eficacia del compuesto Alfa contra diferentes estadios de *Fasciola hepatica* en toretes infectados en forma natural

Grupo (n=6)	Dosis mg/kg/po	Fasciolas recuperadas			% Eficacia			
		Adultas (media ± EE*, rango)	Inmaduras (media ± EE, rango)	Total (x) ± EE, rango)	reduccion de huevos	reducción de fasciolas	Promedio	
1	10	7.6 ^{ab} ± 5.2 (0 - 27)	2.2 ^{a,b} ± 1.6 (0 - 8)	9.8 ± 6.8 (0 - 35)	87.5 ^a	83.4	86.7	84.2
2	12	0 ^a ± 0	0.2 ^a ± .04 (0 - 1)	0	99.1 ^{a,b}	100	98.7	99.6
3	14	0 ^a ± 0	0 ^a ± 0	0	100 ^b	100	100	100
4	Testigo	45.8 ^b ± 18.9 (14 - 118)	16.6 ^b ± 4.7 (9 - 31)	62.4 ± 24 (24 - 149)	-----	-----	-----	-----

* Error Estandar

a,b, Diferentes letras en la misma columna indican diferencias estadísticas (P<0.051).

Fig. 1.1 Distribucion de tallas de fasciolas recuperadas de novillos no tratados e infectados en forma experimental

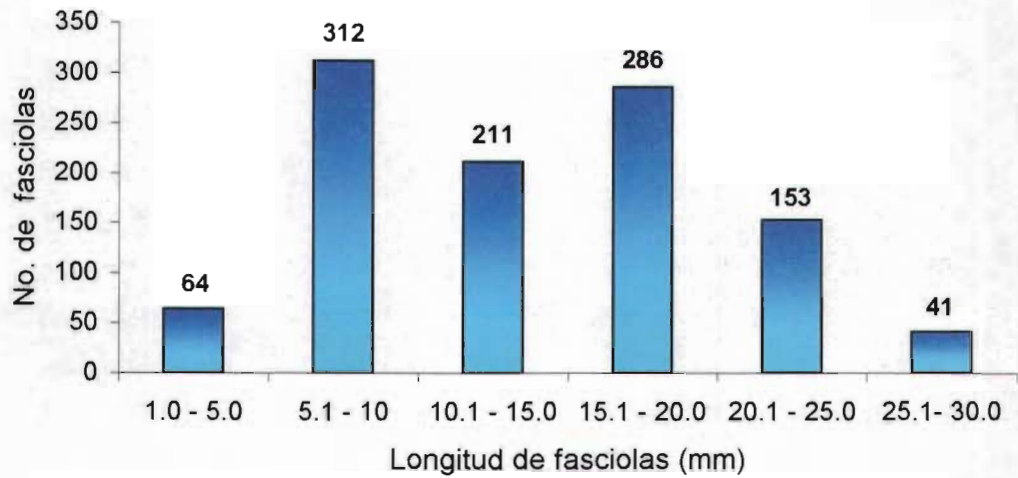
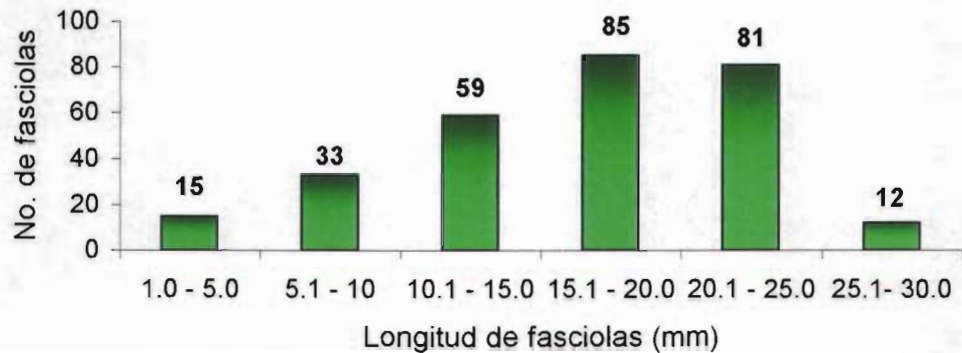


Fig. 1.2 Distribucion de tallas de fasciolas recuperadas del grupo testigo en toretes infectados en forma natural



VII. Experimento 2

EFICACIA DEL 5-CLORO-2-METILTIO-6-(1-NAFTILOXI)-1H-BENCIMIDAZOL CONTRA *Fasciola hepatica* DE 4 Y 10 SEMANAS DE EDAD EN BOVINOS

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue el de evaluar la eficacia fasciolicida del 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol denominado compuesto Alfa contra Fasciolas de 4 y 10 semanas de edad en bovinos. Se utilizaron 15 novillos libres de infección por *Fasciola hepatica* los cuales se infectaron por vía oral con 300 metacercarias administradas 150 en el día 0 y 150 en el día 45. A todos los bovinos se les tomaron muestras de heces para corroborar la presencia del parásito mediante análisis coprológicos. En el día 75, los grupos 1 y 2 fueron tratados con los compuestos Alfa y Triclabendazol a una dosis única de 12 mg/kg, vía oral. El grupo 3 quedó como testigo sin tratamiento. A los 45 días postratamiento, todos los bovinos fueron sacrificados para separar el hígado y cuantificar los vermes presentes. La eficacia se midió con base en el número de fasciolas presentes en los grupos tratados con respecto al testigo. Los resultados indicaron un 100% y un 99.4% de reducción de fasciolas de 4 y 10 semanas de edad respectivamente para el compuesto Alfa, y de 100% para el triclabendazol contra fasciolas de 4 y 10 semanas de edad. No se observaron diferencias estadísticas con respecto a la eficacia de ambos antihelmínticos. Con referencia a la distribución de tallas de fasciolas obtenidas se observó un pico principal de 73 fasciolas con tallas que oscilaban entre 30.1 a 35 mm, encontrando fasciolas de 20.1 mm hasta 45.0 mm de longitud. La talla menor de fasciolas encontradas fue de 20.1 mm y la talla mayor fue de 43.1 mm. Se concluye que el compuesto Alfa mostró alta eficacia contra fasciolas de 4 y 10 semanas de edad.

INTRODUCCION

Desde hace algunos años, se han hecho esfuerzos con miras a desarrollar un fármaco anti-Fasciola que sea eficaz contra diversos estadios evolutivos del parásito (Ibarra *et al*, 1995a; 1995b). A partir de un escrutinio preliminar de varios compuestos (Ibarra *et al*, 1995c) se ha seleccionado un derivado de los bencimidazoles llamado compuesto Alfa el cual a través de diversos estudios, tanto quimioterapéuticos como farmacológicos, ha mostrado un aceptable potencial contra fasciolas juveniles y adultas en ovinos (Ibarra *et al*, 1996; 1997; 2000; Vázquez, 1997; Rivera, 2000). Sin embargo, es importante determinar si el compuesto Alfa es igualmente eficaz en bovinos, en virtud de que la población de vacunos en México rebasa por mucho a la ovina.

En un estudio previo realizado en bovinos infectados en forma natural, se evaluó la eficacia del compuesto experimental alfa, a dosis de 12 mg/kg por vía oral, el cual mostró un porcentaje de reducción de huevos, de 90.1% y 85.3%, a los 14 y 21 días postratamiento, respectivamente (Ibarra *et al*, 2002). Con base en estos resultados, se decidió valorar el efecto del compuesto a través de una prueba controlada en bovinos, para determinar eficacia con base al porcentaje de reducción de fasciolas.

OBJETIVO

El objetivo del trabajo fue el de evaluar la eficacia fasciolicida del 5 - cloro-2-metiltilio-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol contra fasciolas de 4 y 10 semanas de edad en bovinos infectados en forma experimental.

MATERIAL Y METODOS

Localización del estudio.- El estudio se realizó en el Centro Experimental Pecuario “Las Margaritas”, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), localizado en Hueytamalco, Puebla y en las Facultades de Química y Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Animales.- Se utilizaron 15 bovinos de sexo indistinto entre 1 y 2 años de edad, libres de infección por *F hepatica*, los cuales fueron infectados cada uno por vía oral con 300 metacercarias administradas 150 el día 0 y 150 el día 45. Las metacercarias fueron adquiridas en la Universidad de Oregon, Estados Unidos de América y se obtuvieron de caracoles *Lymnaea columella* previamente infectados en el laboratorio con miracidios de origen bovino.

Compuestos experimentales.- Se utilizaron los compuestos Alfa y triclabendazol ambos formulados en suspensión al 10%.

Desarrollo del experimento.- A la semana 10 de la infección (fecha en que las fasciolas administradas tenían 4 y 10 semanas de edad respectivamente), los bovinos se dividieron al azar en tres grupos de 5 animales cada uno, para realizar los tratamientos:

El grupo 1 recibió el compuesto Alfa a una dosis única de 12 mg/kg/p.o.

El grupo 2 recibió Triclabendazol a una dosis única de 12 mg/kg/p.o.

El grupo 3 fungió como testigo infectado sin tratamiento.

Toma de muestras.- A todos lo bovinos se les realizó exámen coproparasitológico por medio de la técnica de sedimentación (Sánchez, 1989) a las 0, 10 y 13 semanas postratamiento.

Evaluación.- A los 45 días postratamiento, todos los bovinos fueron sacrificados con la finalidad de extraer el hígado para coleccionar y contar el número de fasciolas presentes y así determinar el porcentaje de reducción de trematodos en los grupos tratados en relación con el número de parásitos presentes en el grupo testigo.

Análisis estadístico.- Los datos de eficacia obtenidos fueron comparados entre grupos utilizando una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, con ayuda del paquete estadístico SAS (1982).

RESULTADOS

Eficacia (porcentaje de reducción de fasciolas).- La información obtenida se muestra de manera general en el cuadro 2.1.

Los resultados indicaron una eficacia de 100 y 99.4% contra fasciolas inmaduras (4 semanas) y adultas (10 semanas) respectivamente para el Grupo 1 (compuesto Alfa) y de 100% para fasciolas inmaduras y adultas en el Grupo 2 (triclabendazol). (Cuadro 2.1).

Con referencia al Grupo 3 (testigo sin tratamiento), se colectó un total de 170 trematodos con un promedio de 34 vermes por bovino, con un mínimo de 28 y un máximo de 41 fasciolas en el grupo.

El análisis estadístico determinó diferencias significativas entre grupos ($P < 0.0023$). Al analizar eficacia entre los grupos tratados 1 y 2 no se demostró diferencia significativa ($P > 0.05$). Sin embargo, al analizar los grupos tratados contra el testigo, se demuestran diferencias significativas ($P < 0.0095$).

Diagnóstico coprológico.- Se encontraron huevos del parásito desde la semana 10 postratamiento; observándose un total de 66 huevos en el grupo, con un mínimo de 6 y máximo de 23. En la semana 13, la producción aumentó ligeramente a razón de 98 huevos, con un mínimo de 12 y un máximo de 30.

Longitud de fasciolas.- La distribución de tallas de las fasciolas recuperadas en el grupo testigo sin tratamiento mostró dos picos principales en el que se localizaron el mayor número de trematodos: Uno conformado con 57 fasciolas las cuales midieron entre 25.1 y 30.0 mm y otro conformado con 73 fasciolas que midieron entre 30.1 y 35.0 mm de longitud. La talla menor de fasciolas encontradas fue de 20.1 mm y la talla mayor fue de 43.1 mm (Fig 2.1).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Aun cuando se trata de un estudio preliminar, el compuesto alfa mostró tener un alto potencial de eficacia, ya que en otros estudios realizados con triclabendazol, este compuesto muestra eficacia inferior a la encontrada en este estudio (97.8% Richards *et al*, 1990; 90% Lecuyer *et al*, 1985; 96.9% Rapic *et al*, 1988).

En virtud de que los animales se sacrificaron 6 semanas después del tratamiento, no se podía constatar cuántas fasciolas eran de 4 y cuántas de 10 semanas de edad. Sin embargo, el hecho de que no se observaron trematodos en los grupos tratados (excepto 1 de 2.3 cm. de longitud), se deduce que ambos compuestos fueron similarmente eficaces contra ambas edades del parásito.

En el presente estudio la eficacia ligeramente menor conferida por el compuesto alfa se debió a que se encontró una Fasciola, lo cual genera un porcentaje inferior no significativo con respecto al grupo tratado con triclabendazol.

Sin duda alguna, futuros estudios sobre eficacia del compuesto alfa contra diversas edades de *Fasciola*, en estudios controlados con infección experimental y natural, mostrarán el potencial real del fármaco como fasciolicida para bovinos.

Se concluye que el compuesto alfa mostró una eficacia promisoriosa contra fasciolas de 4 y 10 semanas de edad en bovinos

REFERENCIAS

- Ibarra VF, Vera MY, Olazarán JS, Hernández CA, Castillo BR. Fasciolinip-1: eficacia fasciolicida experimental en ovinos. *Rev Latinoam Microbiol* 1995a;37:171-178.
- Ibarra-Velarde F, Vera-Montenegro Y, Olazarán-Jenkins S, Hernández-Campos A, Castillo-Bocanegra R. Fasciolinip-2: eficacia fasciolicida experimental en ovinos. *Parasitología Día* 1995b;19:113-118.
- Ibarra-Velarde F, Vera-Montenegro Y, Hernández-Campos A, Castillo-Bocanegra, R. Síntesis de un compuesto fasciolicida experimental y su evaluación *in vitro* e *in vivo* en conejos. *Téc. Pec. Méx* 1995c; 33:17-24.
- Ibarra-Velarde F, Vera-Montenegro Y, Hernández-Campos A, Castillo-Bocanegra R, Eficacia de un compuesto experimental contra *Fasciola hepatica* juvenil y adulta en ganado ovino. *Vet Méx* 1996; 27:119 -122.
- Ibarra Velarde F, García-Sánchez E, Fernández-Ruvalcaba M, Vera-Montenegro Y, Castillo-Bocanegra R, Hernández-Campos A. Eficacia fasciolicida *in vitro* e *in vivo* en ovinos de dos compuestos de síntesis química. *Vet Méx* 1997;28: 291-296.
- Ibarra VF, Montenegro CN, Flores CJ, Hernández CA, Castillo BR. Evaluación de cuatro vehículos para formular un fasciolicida experimental. *Vet Méx* 2000; 31:47-51.

- Ibarra VF, Cristino MN, Vera MY, Castillo BR, Hernández CA, Ochoa GP. Eficacia comparativa de un fasciolicida experimental, triclabendazol y closantel en bovinos infectados en forma natural con *Fasciola hepatica*. Vet Méx 2002; 33(3): 24-29.
- Lecuyer B, Bordas CH, Marchand C, Nguyen HN, Sourd CH. Investigation of the Fasciolicide activity of triclabendazole in cattle in Nievre, France. Bulletin de la Société Veterinaire Pratique de France 1985;69(8):507-513.
- Rapic D, Dzakula N, Sakar D, Richards RJ. Comparative efficacy of triclabendazole, nitroxynil and rafoxanide against immature and mature *Fasciola hepatica* in naturally infected cattle. Vet. Rec 1988;22:59-62.
- Richards RJ, Bowen FL, Essenwein F, Steiger RF, Buscher G. The efficacy of triclabendazole and other anthelmintics against *Fasciola hepatica* in controlled studies in cattle. Vet. Rec 1990;26:213–216.
- Rivera FN. Evaluación de la eficacia del compuesto alfa contra *Fasciola hepatica* de diversas edades en ovinos. (tesis de maestría). México, D.F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia . UNAM, 2000
- Sanchez AA. Coprología diagnóstica de helmintos y protozoarios del aparato digestivo. En: Campos RR, Bautista GR editores. Diagnóstico de helmintos y hemoparásitos de rumiantes. Cuernavaca Morelos, México. Asociación Mexicana de Parasitología Veterinaria. A.C, 1989: 9-39.
- Statistical Analysis Systems (SAS), 1990. Institute Inc.:SAS/STAT. User's guide: 4th ed. Cary (NC).
- Vázquez Peláez C. Eficacia de un compuesto experimental contra *Fasciola hepatica* juvenil y adultos en ovinos criollos. Vet Méx 1997; 28:297-301.

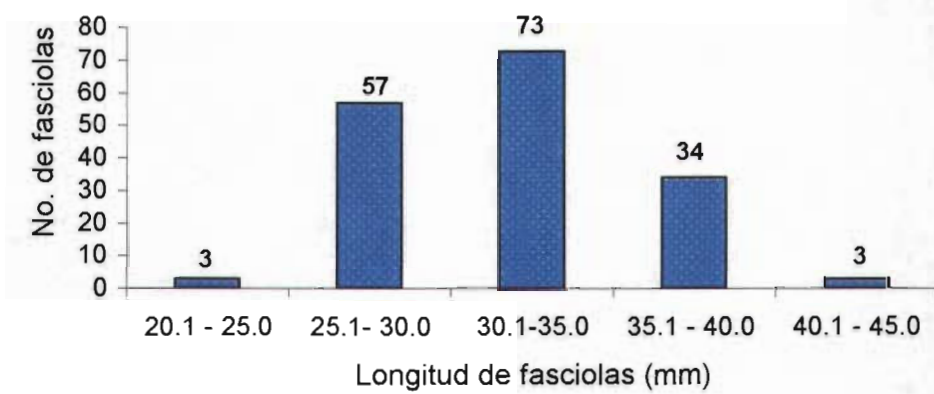
Cuadro 2.1. Eficacia fasciolicida de los compuestos Alfa y Triclabendazol en bovinos

GRUPOS (N = 5)	Número de bovino	Número de huevos/5 g de heces SEMANS			Número de Fasciolas	% EFICACIA	
		0	10	13		Inmaduras 4 sem**	Adultas 10 sem
1 Alfa	1	0	0	0	0		
	2	0	0	0	0		
	3	0	1	2	1	100	99.4a
	4	0	0	0	0		
	5	0	0	0	0		
2 Tcb*	6	0	0	0	0		
	7	0	0	0	0		
	8	0	0	0	0	100	100a
	9	0	0	0	0		
	10	0	0	0	0		
3 Testigo	11	0	14	19	36		
	12	0	13	23	41		
	13	0	23	30	36	0	0b
	14	0	10	12	29		
	15	0	6	14	28		

^{a,b} Valores con distinta literal indican diferencia estadística (P < 0.0023)

* Triclabendazol; **semanas

Fig. 2.1 Distribución de tallas de fasciolas recuperadas en el grupo testigo



VIII. Experimento 3

EVALUACION DE LA EFICACIA DEL COMPUESTO ALFA CONTRA FASCIOLAS DE DIVERSAS EDADES EN BOVINOS

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue el de evaluar la eficacia del 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxy)-1*h*-benzimidazol llamado compuesto alfa, contra *Fasciola hepatica* de diversas edades. Para ello se utilizaron 32 vaquillas libres de la infección por fasciola, las cuales se dividieron en 8 grupos siendo infectados con 150 metacercarias por animal. Posteriormente todos los animales recibieron una segunda infección con otras 150 metacercarias dosificadas a diferentes intervalos con la finalidad de producir fasciolas de diferentes edades en los animales experimentales. Cuando las fasciolas alcanzaron la edad requerida en las vaquillas se trataron cuatro grupos con una dosis oral de 12mg/kg del compuesto alfa y los animales remanentes sirvieron como testigos sin tratamiento. A las dos semanas posteriores al tratamiento todos los bovinos fueron sacrificados y sus hígados removidos para determinar el número de parásitos presentes en los grupos tratados y no tratados. En los grupos tratados el porcentaje de reducción de fasciolas de 3días/2semanas fue de 100%, en el de 3/4 semanas fue de 96.4%, en el de 6/8 semanas fue de 99% y para el grupo de 10/12 semanas fue de 100%. Se concluye que el compuesto alfa mostró una eficacia altamente promisorio contra fasciolas de diversas edades en vaquillas infectadas experimentalmente.

INTRODUCCIÓN

Una de las características principales para conformar al fasciolicida ideal es el que tenga buena eficacia contra todos los estadios evolutivos del parásito (Boray, 1982).

En los años 70's salio al mercado la Diamfenetida (Coriban - Welcome) compuesto que mostró alta eficacia contra los estadios inmaduros del parásito, sin embargo Harfenist (1973) y Düwel (1981) señalaron que el compuesto era menos eficaz contra fasciolas adultas.

Otros productos como Rafoxanida (Ross, 1970; Armour and Corba, 1970), Nitroxinil (Richards *et al*, 1990; Dobbins y Wellington, 1982), Closantel (Maes *et al*, 1985, 1990) y Clorsulon (Malone *et al*, 1984) han mostrado ser eficaces contra fasciolas de 6 semanas de edad en adelante, razón por la cual no se puede cortar completamente el ciclo evolutivo del parásito. En 1983 surgió el triclabendazol (Fasinex- CIBA - GEIGY) el cual ha mostrado alta eficacia contra la mayoría de estadios evolutivos en fasciola. Sin embargo Dorchies en 1983 y Rapic *et al*, 1998 demostraron que el producto no es 100% efectivo a la dosis recomendada por el fabricante. Por otro lado es importante señalar que este fasciolicida enfrenta graves problemas de resistencia razón por la cual cada vez se observan eficacias menores (Moll *et al*, 2000; Gaasenbeek *et al*, 2001).

Por otro lado el compuesto "Alfa" ha mostrado un potencial altamente promisorio contra fasciolas juveniles y adultas en ovinos. Sin embargo se desconoce la actividad fasciolicida de este compuesto en bovinos razón por la cual se diseño el presente estudio.

OBJETIVO

Evaluar la eficacia fasciolicida del 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)1*H* bencimidazol (compuesto alfa) contra fasciolas de 3 días, 2, 3, 4, 6, 8, 10 y 12 semanas de edad en vaquillas infectadas experimentalmente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Localización del estudio.- El estudio se realizó en las instalaciones del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria (CENID – PAVET) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) localizado en Jiutepec, Morelos.

Animales.- Se utilizaron 32 vaquillas entre 1 y 2 años de edad, libres de la infección por *F. hepatica*, los cuales se alimentaban con alfalfa y alimento comercial pellets para bovinos y agua *ad libitum*.

Compuesto experimental.- Se utilizó el compuesto experimental "ALFA" formulado en suspensión al 10%, el cual se administró por vía oral a la dosis única de 12 mg/kg.

Desarrollo del experimento.- En el día 0, todos los bovinos fueron infectados con 150 metacercarias de *F. hepatica* por animal, estos fueron aretados y a su vez divididos en 8 grupos de 4 animales c/u. Posteriormente se dio una segunda infección con otras 150 metacercarias las cuales se administraron a diferentes intervalos de tiempo para producir fasciolas de diferentes edades en los animales como se indica en el esquema del diseño experimental.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Edad de fasciolas por grupo	Grupos (n = 4)	Infección 150 met/anim	2a. Infección 150 met/anim	Tratamiento Compuesto Alfa 12 mg/kg/oral	Sacrificio 15 días post-Tx
3d/2s	1	Día 0	Día 11	Día 14	†
	2			testigo/no tratado	
3s/4s	3	Día 0	Día 7	Día 28	†
	4			testigo/no tratado	
6s/8s	5	Día 0	Día 14	Día 56	†
	6			testigo/no tratado	
10s/12s	7	Día 0	Día 14	Día 84	†
	8			testigo/no tratado	

met = metacercarias de *Fasciola hepatica*/ animal

d = días; s = semanas

Tx = Tratamiento

Sacrificio de animales.- Dos semanas después del tratamiento de cada grupo, los bovinos fueron sacrificados con su correspondiente grupo testigo. Después del sacrificio los hígados fueron trasladados al laboratorio en bolsas de plástico para su posterior disección y recuperación de las fasciolas adultas e inmaduras como lo describe Boray et al, (1983).

Evaluación de la eficacia.- El porcentaje de eficacia fue calculada de acuerdo a la fórmula descrita por Foreyt (1988)

Número de fasciolas en el grupo testigo -- Número de fasciolas en el grupo
tratado

% Eficacia = ----- X 100

Número de fasciolas en el grupo testigo

Análisis estadístico.- Para comparar el número de fasciolas de cada grupo con su correspondiente grupo testigo, se realizó una prueba no paramétrica de Wilcoxon. Adicionalmente se utilizó la prueba de Kruskal – Wallis para comparar el número de fasciolas presentes entre los grupos tratados. (Ott, 1988).

RESULTADOS

Los resultados para los grupos experimentales fueron los siguientes:

Grupos 1 y 2 (fasciolas de 3 días y 2 semanas de edad).- No se recuperaron fasciolas de las vaquillas pertenecientes a los grupos tratados. El número de trematodos obtenidos de su grupo testigo fue 44. La eficacia obtenida para este grupo fue del 100% (Cuadro 3.1).

Grupos 3 y 4 (fasciolas de 3-4 semanas de edad).- En este grupo se colectaron 2 fasciolas del grupo tratado. Su correspondiente grupo testigo tuvo un total de 56 trematodos, generando un 96.4% de eficacia (Cuadro 3.1).

Grupos 5 y 6 (fasciolas de 6 y 8 semanas de edad).- Aquí solamente se obtuvo una fasciola proveniente del grupo tratado. El grupo Testigo tenía un total de 135 fasciolas correspondiendo a una eficacia del 99.2% (Cuadro 3.1).

Grupos 7 y 8 (fasciolas de 10 y 12 semanas de edad).- No se recuperaron fasciolas en las vaquillas tratadas en este grupo. Así mismo el número de fasciolas recuperadas en los animales del grupo testigo fue de 62, por lo cual corresponde a una eficacia del 100% (Cuadro 3.1).

La eficacia del compuesto alfa en la reducción de los diferentes estados evolutivos de *F. hepatica* fue significativa ($P < 0.05$) en los grupos tratados en relación a los grupos testigo sin tratamiento. No se observaron diferencias estadísticas en la eficacia cuando se realizaron comparaciones entre los grupos tratados. Sin embargo, se determinaron diferencias estadísticas ($P < 0.01$) entre el número de fasciolas pertenecientes a los cuatro grupos testigo sin tratamiento (Cuadro 3.1).

El cuadro 3.2 muestra la recuperación individual de fasciolas de todos los grupos. Aquí la recuperación de fasciolas inmaduras tempranas fue menor a la de fasciolas adultas.

Es importante notar que solo dos fasciolas inmaduras tempranas y una fasciola inmadura fueron recuperadas de todos los grupos tratados.

En el Cuadro 3.3 se muestra la frecuencia de distribución de *F. hepatica* en las vaquillas experimentales. Aquí se observan 3 bloques de distribución del parásito. El primero incluye 100 fasciolas ubicadas en el rango de 2.0 a 7.9 mm. El segundo integra 148 fasciolas desde 16.0 a 32.9 mm. Finalmente el tercero tuvo 28 trematodos los cuales midieron desde 33.0 a 40 mm.

Con relación a la longitud de las 3 fasciolas provenientes de los grupos tratados, esta fue de 5.0, 7.0 y 1.6 mm, respectivamente (Cuadro 3.3).

Con respecto a los análisis de sueros evaluados previamente, mediante la prueba de ELISA, mostraron negatividad a anticuerpos de *F. hepatica*. Estos fueron detectados positivos desde la tercera semana postinfección con el parásito mostrando con esto que todos los animales estaban infectados con el trematodo. Como era de esperarse las vaquillas que solamente tenían fasciolas adultas (10 – 12 semanas de edad) fueron positivas al exámen coprológico por sedimentación.

DISCUSIÓN

Es bien sabido que la mayoría de bencimidazoles muestran actividad solo contra *F. hepatica* adulta a dosis muy altas (Bradley et al, 1981). Solamente TCB ha demostrado capacidad para matar fasciolas desde una semana de edad (Turner et al 1984). Sin embargo, cuando el TCB fue evaluado en vaquillas a dosis de 12 mg/kg/p.o contra fasciolas de 4 y 6 semanas de edad, este mostró una eficacia de 81.2 y 85.4%, respectivamente (Boray 1982).

Recientemente Ibarra *et al* (2001) observaron que TCB mostró menor actividad fasciolicida (71.7%) contra estadios inmaduros del parásito cuando se evaluó a la dosis recomendada en ganado infectado en forma natural con el trematodo.

En este estudio el compuesto Alfa mostró mayor eficacia contra fasciolas de 4 y 6 semanas.

En otro estudio Vera *et al* (2003) determinaron el porcentaje de reducción de huevos de fasciola en ganado infectado en forma natural, obteniendo una eficacia de 97% a dosis de 12 mg/kg/p.o. También es importante hacer notar que el compuesto alfa elimina el problema de falta de actividad mostrada por los viejos fasciolicidas como meniclofolan, nitroxinil, rafxanide, albendazol, closantel y clorsulon entre otros (Cordero del Campillo y Rojo Vázquez, 1999).

Con relación a la longitud de fasciolas, Buscher et al, (1987) menciona la capacidad de ciertas drogas de afectar la talla y retardo en el desarrollo de los parásitos. En este estudio, el promedio de longitud de fasciolas de los grupos tratados fue siempre ligeramente menor que el de los grupos testigo sin tratamiento. Sin embargo, no fue posible determinar si el compuesto alfa realmente afectó la talla de los parásitos en virtud de las pocas fasciolas colectadas en los animales tratados con el fármaco. Por lo tanto se sugiere la conducción de futuros estudios en los que se utilicen dosis subletales del

compuesto para comparar las tallas de trematodos tratados y no tratados. Esto será relevante para determinar si el compuesto alfa es capaz de producir una extensión del periodo prepatente.

Wood et al (1995) mencionaron que 400 metacercarias de *F. hepatica* es una dosis recomendable para obtener un aproximado de 50 fasciolas en bovinos. En el presente estudio el número total de quistes dosificado por animal fue de 300 el cual mostró un establecimiento variable de fasciolas, particularmente en los grupos 1 y 2. Como explicación a esto se tiene que las fasciolas en estos grupos fueron pequeñas y aun cuando los sedimentos resultantes fueron examinados cuidadosamente bajo microscopio en solución salina precalentada, posiblemente alguna de ellas pudieron haberse extraviado. Sin embargo, la eficacia pudo ser medida en virtud de que su correspondiente grupo testigo fue manejado bajo las mismas condiciones, manteniendo un número suficiente de fasciolas con las cuales se demostraba la actividad generada contra los trematodos.

Torgerson y Claxton (1999) mencionan que en los países no industrializados los antihelmínticos pueden ser prohibitivamente costosos. Por tal razón, se manifiesta la necesidad de producir un fasciolicida seguro y menos costoso.

Hasta ahora uno de los fasciolicidas generalmente más recomendados es el TCB el cual hoy en día enfrenta problemas de resistencia (Lammert et al, 2000; Thomas et al 2000; Gaasenbeek et al 2001) y por otro lado no se ha lanzado al mercado ningún nuevo fasciolicida desde hace 20 años. Por lo tanto se debe de impulsar el desarrollo de un nuevo fasciolicida que sea más seguro y barato.

El presente estudio provee demostración experimental de alta eficacia ejercida por el compuesto alfa contra infecciones inducidas de *Fasciola hepatica* de diversas edades en bovinos. Estos resultados son comparables con aquellos obtenidos utilizando los fasciolicidas actuales para rumiantes a nivel mundial.

REFERENCIAS

- Armour J, Corba J. The anthelmintic activity of radoxanide against immature *Fasciola hepatica* in sheep. *Vet. Rec.* 1970; 87: 213–214.
- Boray JC. Chemotherapy of fasciolosis. New South Wales. *Vet Proc* 1982;18:42-47
- Boray JC, Crowfoot PD, Strong MB, Allison JR, Schellenbaum M, Von Orelli M, Sarasin G. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. *Vet Rec* 1983; 113:315-317.
- Bradley RE, Randall WF, Armstrong DA. Anthelmintic efficacy of albendazole in calves with naturally acquired *Fasciola hepatica* infections. *Am J Vet Res* 1981; 42:1062-1064
- Buscher G, Bowen FL, Strong MB, Allison JR, Richards RJ. Extension of the prepatent period of *Fasciola hepatica* in infected animals following treatment with Triclabendazole. *Vet Rec* 1987; 120:460-461
- Rojo Vázquez FA, Ferré Pérez I. Fasciolosis. In: Cordero del Campillo M, Rojo Vázquez FA, editors. *Parasitología Veterinaria*. Madrid, España: Mc. Graw-Hill-Interamericana, 1999; 260-272.
- Del Rivero LM. Farmacocinética del Alfa-BioF10 en borregos (tesis de Maestría). D.F, México: Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, 1998.
- Dorchies PF, Ducos de Lahitte J. Study on the activity of triclabendazole (DCI) against *Fasciola hepatica* in lambs. *Revue. Med. Vet.* 1983; 134: 231-234
- Düwel D. Zur Behandlung der Helminthosen bei Wiederkäuern – Eine Übersicht. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 1981; 94: 378–382.
- Foreyt WJ. Efficacy of fenbendazole-triclabendazole combination against *Fasciola hepatica* and gastrointestinal nematodes in sheep. *Vet. Parasitol.* 1988; 26:265-271.

- Gaasenbeek CPH, Moll L, Cornelissen JBWJ, Vellema P, Borgsteede FHM. An experimental study on triclabendazole resistance of *Fasciola hepatica* in sheep. *Vet. Parasitol.* 2001; 95: 37-43.
- Harfenist M. Diamphenetide – A new fasciolicide active against immature parasites. *Pestic. Sci.* 1973; 4: 871 -882.
- Hernández CA, Ibarra VF, Vera MY, Rivera FN, Castillo BR. Synthesis and Fasciolicidal Activity of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthyloxy)-1*H*-benzimidazole. *Chem Pharm Bull* 2002; 50: 649-652
- Ibarra VF, Vera MY, Hernández CA, Castillo BR. Eficacia de un compuesto experimental contra *F. hepatica* juvenil y adulta en ganado ovino. *Vet Méx* 1996; 27:119-122
- Ibarra VF, García SE, Fernández RM, Vera MY, Hernández CA, Castillo BR. Eficacia de dos compuestos de síntesis química *in vivo* e *in vitro* en ovinos. *Vet Méx* 1997^a; 28: 4-11
- Ibarra VF, García SE, Vera MY, Hernández CA, Castillo BR. Eficacia fasciolicida del compuesto Alfa contra estadios juveniles y adultos en ovinos. *Vet Méx* 1997^b; 28: 4-8
- Ibarra F, Montenegro N, Vera Y, Boulard C, Quiroz H, Flores J, Ochoa P. Comparison of three ELISA tests for seroepidemiology of bovine fasciolosis. *Vet Parasitol* 1998; 77: 229-236
- Ibarra VF, Vera MY, Montenegro CN, Flores CJ, Hernández CA, Castillo BR. Evaluación de cuatro vehículos para formular un fasciolicida experimental. *Vet Méx* 2000; 31: 47-51
- Ibarra VF, Vera MY, Nájera FR, Sánchez AA. Efficacy of combined chemotherapy against gastrointestinal nematodes and *Fasciola hepatica* in cattle. *Vet Parasitol* 2001; 99:199-204
- Lammert M, Gaasenbeek CPH, Vellema P, Borgsteede FHM. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. *Vet Parasitol* 2000; 91;153-158.

- Maes L, Monbaliu J, Michiels M, Desplenter L. Closantel in the control of *Fasciola hepatica* in sheep. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale* 1985; 65: 390 – 391.
- Maes L, Vanparijs O, Lawers H, Deckers W. Comparative efficacy of closantel and triclabendazole against *Fasciola hepatica* in experimentally infected sheep. *Vet Rec* 1990; 127: 450-452.
- MAFF (Ministry of Agriculture Fisheries and Food). Manual of veterinary parasitological laboratory techniques (reference book 418), 3rd ed. Ministry of Agriculture Fisheries and Food, London. 1988.
- Malone JB, Ramsey RT, Loyacano AF. Efficacy of clorsulon for treatment of mature naturally acquired and 8-week-old experimentally induced *Fasciola hepatica* infections in cattle. *Am J Vet Res* 1984; 45: 851–854.
- Moll L, Gaasenbeek CPH, Vellema P, Borgsteede FHM. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in the Netherlands. *Vet. Parasitol.* 2000; 91, 153-158.
- Ott L. An introduction to statistical methods and data analysis. 3rd ed. Boston: PWS – KENT, 1988.
- Rapic D, Dzakula A, Sakar D, Richards RJ. Comparative efficacy of triclabendazole, nitroxinil and rafoxanide against immature and mature *Fasciola hepatica* in naturally infected cattle. *Vet. Rec.* 1998; 122: 59-62.
- Richards RJ, Bowen FI, Essenwein F, Steiger RF, Buscher G. The efficacy of triclabendazole and other anthelmintics against *Fasciola hepatica* in controlled studies in cattle. *Vet Rec* 1990; 126: 213 – 216.
- Rivera FN, Ibarra VF, Olazarán JS, Vera MY, Castillo BR, Hernández CA. Eficacia del 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-ih-bencimidazol contra diversas edades de *Fasciola hepatica* en ovinos Pelibuey. *Vet Méx* 2002; 33:55-61.
- Ross DB. Treatment of experimental *Fasciola hepatica* infection of sheep with rafoxanide. *Vet. Rec.* 1970; 87: 110–111.
- Thomas I, Coles GC, Duffus K. Triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica* in southwest Wales. *Vet Rec* 2000; 146:200

- Torgerson P, Claxton J. Epidemiology and Control In: Dalton JP editor. Fasciolosis. New York: CAB INTERNATIONAL, 1999; 113-149.
- Turner K, Armour J, Richards RJ Anthelmintic efficacy of triclabendazole against *Fasciola hepatica* in sheep. *Vet Rec* 1984; 114:41-42
- Vera MY, Ibarra VF, Quiroz RH, Rios UA, Castillo BR, Hernández CA. Eficacia del 5-cloro-2-metiltio-5-(1-naphthyloxy)benzimidazol contra *Fasciola hepatica* de cuatro y diez semanas de edad en bovinos en México. *Vet Méx* 2001; 32:77-80
- Vera MY, Ibarra VF, Quiroz RH, Hernández CA, Castillo BR. Field trial on the efficacy of an experimental fasciocide compared with some commercial compounds in naturally infected cattle. *Parasitol Res.* 2003; 91:1-4.
- Vera MY, Ibarra VF, Liéban HE, Quiroz RH, Castillo BR, Hernández CA, Ochoa GP. Efficacy of an experimental fasciocide against immature and mature *Fasciola hepatica* in artificially infected. *Parasitol Res* 2004; 92: 211-214.
- Vertiz SG. Evaluación farmacocinética del Alfa-BioF10 en ganado vacuno. (tesis de Maestría). México, D.F. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, 2000.
- Wood IB, Amaral NK, Bairden K, Duncan JL, Kassai J, Malone JB, Pankavich JA, Reinecke RK, Slocombe O. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants. *Vet Parasitol* 1995; 58:181-213

Cuadro 3.1 Eficacia del compuesto Alfa contra fasciolas de diversas edades en vaquillas infectadas experimentalmente

Edad de fasciolas	Tratamientos grupos (n=4)	Fasciolas recuperadas			Eficacia %
		Total	Rango	Promedio	
3 días/2 semanas	1 Tratado	0	0	0 ^a	100 ^a
	2 Testigo	44	8 - 14	11 ^b	
3 semanas/4 semanas	3 Tratado	2	0 - 2	0.5 ^a	96.4 ^a
	4 Testigo	56	9 - 17	14 ^b	
6 semanas/8 semanas	5 Tratado	1	0 - 1	0.25 ^a	99.2 ^a
	6 Testigo	135	24 - 42	33.7 ^b	
10 semanas/12	7 Tratado	0	0	0 ^a	100 ^a
	8 Testigo	62	12 - 19	15.5 ^b	

^{a,b} Valores promedio de fasciolas recuperadas con distinta literal en cada nivel de edad son diferentes (P<0.01)

^c No hubo diferencias estadísticas en la eficacia de los grupos tratados (P>0.05)

Cuadro 3.2. Número de trematodos de diversas edades recuperados de vaquillas infectadas con *Fasciola hepatica* tratadas y no tratadas con el compuesto Alfa

Grupos	1 y 2	3 y 4	5 y 6	7 y 8
Edad de fasciolas por grupo	Inmaduras tempranas			
	(3 días 2 semanas)	(3 y 4 semanas)	(6 y 8 semanas)	(10 y 12 semanas)
Tratados	0,0,0,0	0,1,1,0	0,0,1,0	0,0,0,0
Testigo no tratado	9,13,8,14	17,16,9,14	24,40,42,29	19,15,12,16

Cuadro 3.3 Frecuencia de distribución de *F. hepatica* de acuerdo a la longitud de fasciolas en vaquillas infectadas con 300 metacercarias, tratadas y no tratadas con el compuesto Alfa

Edad de fasciolas		Longitud de fasciolas (mm)*																									
Testigo sin Tx		2-	3-	4-	5-	6-	7-	16-	17-	18-	19-	20-	21-	22-	23-	24-	25-	26-	27-	28-	29-	30-	32-	33-	34-	35-	40
		2.9	3.9	4.9	5.9	6.9	7.9	16.9	17.9	18.9	19.9	20.9	21.9	22.9	3.9	24.9	25.9	26.9	27.9	28.9	29.9	30.9	32.9	33.9	34.9	35.9	
3 días /2sem		4	12	8	5	10	5																				
3sem/4 sem					18	28	10																				
6sem/8 sem								1	1	5	6	22	9	13	16	18	12	5	1	3	1	2	2				
10 sem/12 sem											7					7	9	1			7	10	3	13	2		
Grupos tratados																											
3 días/2sem																											
3 sem/4 sem					1		1																				
6 sem/8 sem																											
10 sem/12 sem																											

* = Frecuencias faltantes en la distribución de fasciolas indican que no se registraron trematodos en ese rango de mm.
Tx = tratamiento; sem = semanas

IX. Experimento 4

EVALUACION DE CAMPO SOBRE LA EFICACIA DE UN FASCIOLICIDA EXPERIMENTAL COMPARADO CON ALGUNOS COMPUESTOS COMERCIALES EN GANADO INFECTADO EN FORMA NATURAL

RESUMEN

Se comparó la eficacia del 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1*h*-bencimidazol llamado compuesto Alfa, utilizando tres fasciolicidas comerciales a través del porcentaje de reducción de huevos de *Fasciola hepatica* en bovinos infectados en forma natural. Se utilizaron 50 vacas suizas de 1 – 6 años de edad, previamente determinados como positivos a huevos de parásito mediante la técnica de sedimentación. Los animales se dividieron en cinco grupos (G) de 10 cada uno de acuerdo a los conteos fecales de huevos. El G1 recibió el compuesto Alfa a una dosis de 12 mg/kg por vía oral. El G2 Triclabendazol a 12 mg/kg por vía oral. El G3 Closantel a 3.5 mg/kg por vía subcutánea. El G4 Clorsulón a 2.0 mg/kg subcutáneo. El G5 sirvió como testigo sin tratamiento. Se tomaron muestras de heces los días 0, 7, 14, 21, 28, 60 y 90 días. La Eficacia se midió en los días 14 y 21. Adicionalmente se determinó el Efecto de Extensión (EE) y el Efecto de Intensidad (EI) los cuales se evaluaron en el día 60. Los porcentajes de eficacia para los grupos 1 al 4 fueron de 98.1, 98.7, 98.2 y 97.9 en el día 14 y de 98.5, 97.9, 97.7 y de 97.9 en el día 21, respectivamente. No se observaron diferencias estadísticas entre los grupos tratados.

INTRODUCCIÓN

Como se ha mencionado previamente el compuesto Alfa ha sido motivo de múltiples evaluaciones quimioterapéuticas en ovinos.

Sin embargo, se manifiesta necesario el valorar la actividad biológica de este compuesto en bovinos.

En el presente estudio se evaluó al compuesto Alfa de manera preeliminar bajo condiciones de campo utilizando bovinos infectados en forma natural con *Fasciola hepatica*.

OBJETIVOS

1. Determinar la eficacia del compuesto ALFA, comparado con tres fasciolicidas comerciales a través del porcentaje de reducción de huevos de *F. hepatica* en bovinos infectados en forma natural.
2. Comparar el porcentaje del Efecto Extensión (EE) y Efecto Intensidad (EI) de los fármacos administrados a los bovinos en estudio.

MATERIAL Y METODOS

Localización del estudio.- El trabajo se realizó en el rancho COPALAR, localizado en una zona endémica de fasciolosis en Monte Gordo, Veracruz.

Animales.- Se utilizaron 50 vacas suizas de entre 1 y 6 años de edad infectadas en forma natural con *F. hepatica*

Fasciolicidas.- Compuesto Alfa (compuesto experimental), triclabendazol (TCB) (Ciba-Geigy), clorsulón (Merck) y closantel (Cyanamid). Estos fueron administrados de acuerdo a las dosis recomendadas por el fabricante.

Desarrollo del estudio.- En el día -8 se tomaron muestras de heces de cada uno de los animales para seleccionar mediante la técnica de sedimentación (MAFF,1988) aquellos que tuvieran el mayor número de huevos. En el día 0 se formaron 5 grupos de 10 animales cada uno de acuerdo al conteo de huevos encontrados, para realizar los tratamientos. Los tratamientos se dieron secuencialmente a los animales de cada grupo de la siguiente manera: Grupos (G)1 recibió una dosis única del compuesto alfa a 12 mg/kg/vía oral. El G2 fué dosificado con triclabendazol a una dosis de 12 mg/kg/oral. El G3 recibió closantel a una dosis de 3.5 mg/kg/sc. El G4 recibió clorsulón a una dosis de 2.0 mg/kg/sc. El G5 fungió como testigo sin tratamiento.

Análisis coproparasitoscópicos.- Se colectaron muestras fecales de los bovinos en los días 0, 7, 14, 21, 28, 60 y 90, para realizar los conteos de huevos de *F. hepatica* en 5 g de heces utilizando la técnica de sedimentación (MAFF, 1988). El estudio concluyó en el día 90.

La eficacia de los compuestos fue determinada con base a la reducción de excreción de huevos en los días 14 y 21 después del tratamiento, utilizando la formula descrita por Besvir et al., (1986).

$$\% \text{ Eficacia} = \frac{\text{No. Promedio de huevos en el grupo testigo} - \text{No. promedio de huevos en el grupo tratado}}{\text{No. Promedio de huevos en el grupo testigo}} \times 100$$

Adicionalmente, se calculó en el día 60 el “Efecto Intensidad” (EI) (porcentaje de reducción en la intensidad de huevos excretados en el grupo) y el “Efecto Extensión” (EE) (porcentaje de reducción en el número de animales excretando huevos del grupo) (Eckert *et al*, 1984).

Análisis estadístico.- Los datos sobre la eficacia entre grupos, los cuales tenían como finalidad comparar la reducción de huevos en los días 14 y 21, fueron analizados mediante la prueba de Friedman (Zar, 1996). La información obtenida sobre el EI y el EE de los grupos tratados fueron examinados en búsqueda de significancia utilizando la prueba de Wilcoxon con la finalidad de comparar la reducción de huevos en cada grupo (Zar, 1996). Los datos relacionados con el número de huevos de fasciola de los animales positivos postratamiento con los cuatro compuestos, se sometieron a una transformación de arcoseno expresada como fracción para estimar posibles diferencias (Montgomery, 1984). Posteriormente se aplicó también la prueba de Kruskal Wallis. Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el paquete Statistical Analysis Systems (1990).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos mostraron una eficacia del 97% en la reducción de huevos en todos los grupos en los días 14 y 21 postratamiento. No se observaron diferencias estadísticas entre los grupos tratados (Cuadro 5.1).

Al comparar el comportamiento de los fasciolicidas usando el EI y EE, los resultados no variaron entre grupos, sin embargo las comparaciones realizadas entre tratamientos contra el número de huevos observados en el día -8 fueron estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) en los días 14 y 21 (Cuadro 5.2).

La figura 5.1 muestra los porcentajes de prevalencia con base a los análisis coprológicos con respecto al porcentaje de muestras positivas postratamiento para cada uno de los compuestos, así como para el grupo testigo sin tratamiento. Se observó una clara reducción en el número de huevos en heces sobre el día 7 observándose valores mas bajos para el día 21, posteriormente estos valores aumentan de manera progresiva en todos los grupos siendo todos positivos para el día 60. La transformación de arco seno y las pruebas de Kruskal -Wallis no mostraron diferencias entre los 4 grupos tratados.

Wood *et al*, (1995) mencionan que estos estudios de campo con respecto a la reducción de huevos proporciona información muy importante, aun cuando el número de fasciolas removidas no sea conocido. Adicionalmente los autores mencionan que el tiempo apropiado para evaluar la eficacia de un compuesto es a los 14 o 21 días post-tratamiento.

Por otro lado, Echevarria *et al* (1992) reportaron que existe reducción de huevos aun sin tratamiento en un grupo testigo, tal y como se observa en el grupo testigo de este estudio (Fig 5.1). Quiroz (1977), menciona que la producción de huevos de *F. hepatica* en bovinos declina cuando los tratamos tienen 6 meses de edad o mas. Como nuestros animales tenían una infección natural, nosotros no conocíamos si algunas de las fasciolas eran de 6 meses o mas.

Ibarra *et al* (1987) e Ibarra y Vera (1991) puntualizan que en bovinos infectados en forma natural localizados en un clima húmedo templado, a una dosis oral de triclabendazol a 12 mg/kg no eliminaron todas las fasciolas presentes por que los animales contenían huevos del parásito de 3 semanas postratamiento. No hay duda que el triclabendazol es uno de los fasciolicidas mas recomendados a nivel mundial. Sin embargo, su eficacia no siempre es del 100% (Dorchies and Ducos de Lahitte, 1983; Rapicc *et al* 1998).

Por otro lado, Shing–Sung *et al*, (1995) trataron 41 vacas fasciolosas con closantel a dosis de 5 mg/kg. Los huevos se observaron después de la tercera semana postratamiento indicando con esto que algunas fasciolas sobrevivieron y alcanzaron madurez.

En el presente estudio, el efecto de closantel fue mejor que aquel mencionado previamente.

Wallace *et al*, (1985) e Ibarra *et al*, 2001 obtuvieron un 99 y 100% de eficacia en ganado tratado con clorsulon. Desafortunadamente este fármaco se reporta solamente con buena actividad contra fasciolas que tienen 6 semanas de edad o mayores (Cordero del Campillo y Rojo Vázquez, 1999).

Nuestros resultados muestran una alta eficacia del compuesto Alfa utilizado bajo condiciones de campo. En virtud de que esta es la primera evaluación de campo en ganado, se sugiere en un futuro conducir otros estudios bajo diferentes condiciones de campo con el fin de determinar el potencial real de este compuesto experimental indicado como fasciolicida para el ganado.

CONCLUSIÓN

Se concluye que el compuesto Alfa mostró una aceptable eficacia en bovinos infectados en forma natural, al compararse con diversos fasciolicidas comerciales, aún cuando la actividad fasciolicida ejercida no alcanzó el 100% deseado.

REFERENCIAS

- Besvir J, Rapic D, Dzakula N, Blagovic S, Jelena Pompe-Gotal. Fasinex (Triclabendazole)- New fasciolicide. *Praxis Veterinaria* 1986; 34: 239-242.
- Rojo Vázquez FA, Ferre Pérez I. Fasciolosis. In: Cordero del Campillo M, Rojo Vázquez FA, editors. *Parasitología Veterinaria*. Madrid, España: Mc Graw-Hill-Interamericana, 1999; 260-272.
- Dorchies PF, Ducos de Lahitte J. Study on the activity of triclabendazole (DCI) against *Fasciola hepatica* in lambs. *Revue Med Vet*. 1983;134: 231-234.
- Echevarría FAM, Correa MBC, Wherle RD, Correa IF. Experiments on anthelmintics control of *Fasciola hepatica* in Brazil. *Vet Parasitol* 1992; 43: 211-222.
- Eckert J, Schneiter G, Wolf K. Fasinex (Triclabendazole)-ein neues Fasciolizide. *Berl Munch Tierarztl Wochr*. 1984 ; 91: 249-356.
- Hernández CA, Ibarra VF, Vera MY, Rivera FN, Castillo BR. Synthesis and Fasciolicidal Activity of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthyloxy)-1H-benzimidazole. *Chem Pharm Bull* 2002; 50: 649-652.
- Ibarra VF, Quiróz RH, Perez THJ, Vera MY, Tello RM. Determinación de la extensión del efecto de Triclabendazol, Rafoxanide, Nitroxinil y Meniclofolan en bovinos infectados en forma natural con *Fasciola hepatica*. *Tec Pec Mex*. 1987; 25 (3): 404-408.
- Ibarra Velarde F. y Vera Montenegro Y. Comparación del efecto extensivo de 5 fasciolidas en bovinos en clima cálido. *Vet Mex*. 1991; 22 (2): 159-163
- Ibarra VF, García SE, Fernández RM, Vera MY, Hernández CA, Castillo BR. Eficacia de dos compuestos de síntesis química *in vitro* e *in vivo* en ovinos. *Vet Mex*. 1997; 28 (4): 291-296.
- Ibarra VF, Vera MY, Hernández CA, Castillo BR. Eficacia fasciolida del compuesto Alfa contra estadios juveniles y adultos en ovinos. *Vet Mex*. 1997^a; 28(4): 297-301.

- Ibarra VF, Vera MY, Montenegro CN, Flores CJ, Hernández CA, Castillo BR. Evaluación de cuatro vehículos para formular un fasciolicida experimental. *Vet Mex.* 2000; 31(1): 47–51.
- Ibarra VF, Vera MY, Nájera FR, Sánchez AA. Efficacy of combined chemotherapy against gastrointestinal nematodes and *Fasciola hepatica* in cattle. *Vet Parasitol.* 2001; 99:199-204
- Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. (MAFF) Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques. Technical Bulletin No. 18. Her Majesty's Stationery Office. London, Great Britain. 1988.
- Montgomery D. The design and analysis of experiments. 2nd. Ed. New York: Williams and Sons. INC, 1984.
- Quiroz RH. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. 7ª.ed. México D.F: Limusa, 1997.
- Rapic D, Dzakula A, Sakar D, Richards RJ. Comparative efficacy of triclabendazole, nitroxinil and rafoxanide against immature and mature *Fasciola hepatica* in naturally infected cattle. *Vet Rec.* 1998; 122: 59-62.
- Statistical Analysis Systems (SAS) (1990) Institute Inc.:SAS/STAT. User's guide: 4th ed. Cary (NC)
- Shin-Sung S, Lee-Chung G, Cho-Shinn H, Kim-Jong T, Wee-Sung S, Shin S. Efficacy of closantel for the treatment of naturally-acquired and experimentally induced *Fasciola hepatica* infections in cattle. *Korean J Vet Res* 1995; 35: 347-352.
- Wallace DH, Kilgore RI, Benz GW. Clorsulon: A new fasciolicide for cattle. *Mod. Vet. Pract.* 1985; 66: 879-882.
- Wood IB, Amaral NK, Bairden K, Duncan JL, Kassai J, Malone JB, Pankavich JA, Reinecke RK, Slocombe O, Taylor SM, Vercruysse J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine and caprine). *Vet. Parasitol* 1995; 58: 181-213.
- Zar JH. Biostatistical Analysis. 3rd. Ed. NJ: Prentice Hall, 1996.

Cuadro 4.1 Comparación de la eficacia del compuesto Alfa con otros fasciolicidas en bovinos infectados en forma natural con *Fasciola hepatica*

Compuesto (n = 10 vacas/grupo)	P o r c e n t a j e	
	Días después del tratamiento*	21
Alfa	98.1 ^a	98.5 ^a
Triclabendazol	98.7 ^a	97.9 ^a
Closantel	98.2 ^a	97.7 ^a
Clorsulon	97.9 ^a	97.9 ^a
Testigo no tratado	-----	-----

^a Comparaciones en la misma fila o columna con la misma literal, no son estadísticamente diferentes (P>0.05).

* Comparaciones de tratamientos contra el número de huevos en el día -8 fueron estadísticamente diferentes para el día 14 (P<0.05) y para el día 21 (P<0.01).

Cuadro 4.2. Efecto de Extensión e Intensidad de los compuestos evaluados en bovinos infectados en forma natural con *Fasciola hepatica*

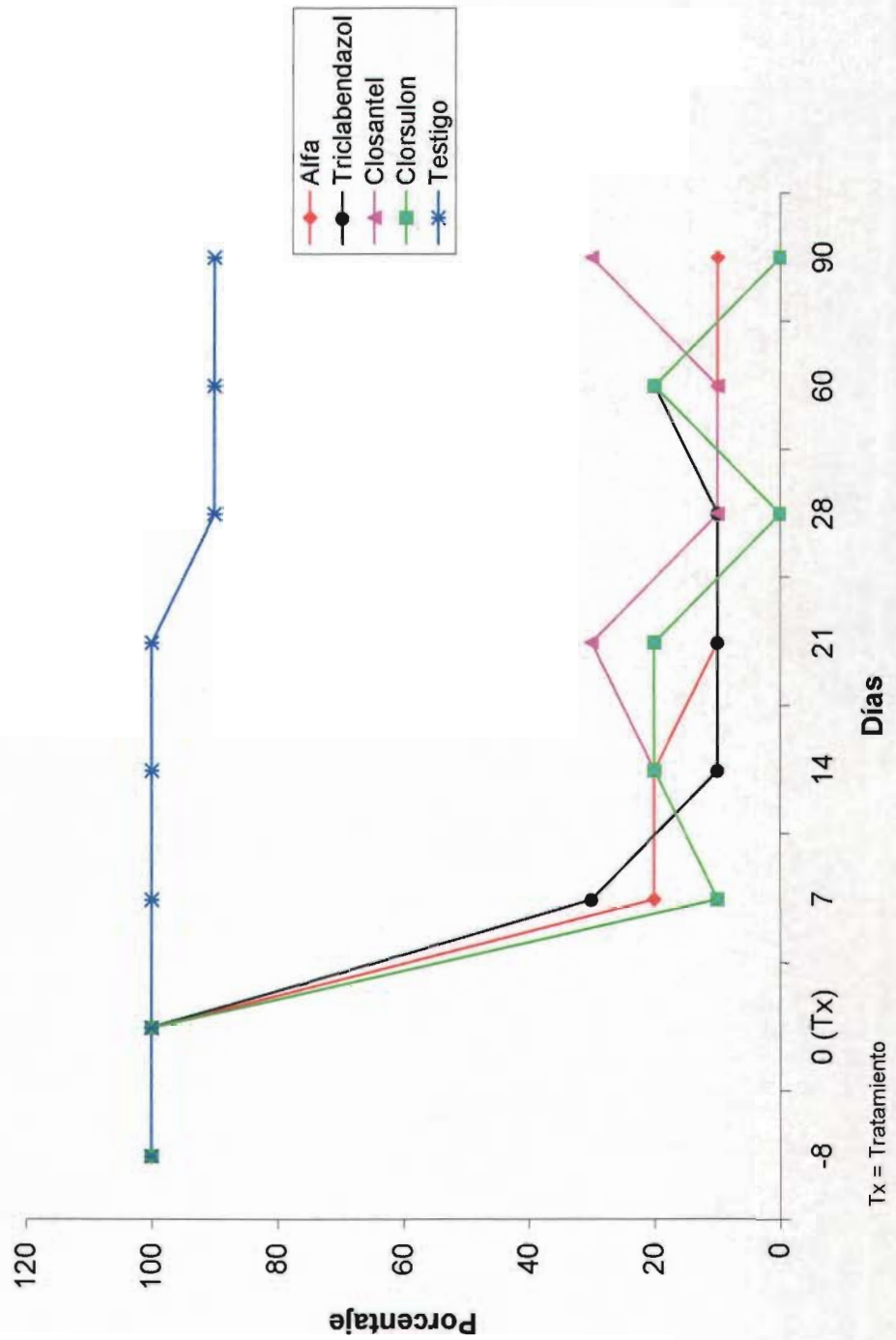
Compuesto (n = 10 vacas/grupo)	Promedio de hpg*		% Efecto intensidad	% animales excretando huevos antes/después del tratamiento	% Efecto Extensión
	Antes del Tx día -8	Después del Tx día 60			
Alfa	26.7a	0.5b	98.1	100/10	90
Triclabendazol	24.3a	0.2b	99.1	100/20	80
Closantel	22.4a	0.2b	99.1	100/10	90
Clorsulon	22.7a	0.5b	97.7	100/20	80

a,b Porcentajes en la reducción de huevos o animales con la misma literal en la misma fila no son estadísticamente diferentes (P< 0.05)

*hpg= huevos por gramo

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Fig. 4.1 Prevalencia de fasciolosis postratamiento con el compuesto Alfa y otros fasciolicidas en bovinos infectados en forma natural



X. Experimento 5

DETERMINACIÓN DE LA DOSIS MÁXIMA TOLERADA E ÍNDICE DE SEGURIDAD DEL COMPUESTO ALFA EN BOVINOS

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue el de determinar la Dosis Máxima Tolerada (DMT) y el Índice de Seguridad (IS) del 5-cloro-2-metil-6-(1-naftiloxi)-1*H*-benzimidazol llamado compuesto Alfa en bovinos. Así como posibles efectos adversos después del tratamiento. Se realizaron mediciones de 14 parámetros bioquímicos, 13 hematológicos y 4 constantes fisiológicas. Se utilizaron dieciocho bovinos criollos que pesaban entre 200 y 300 kg. los cuales fueron divididos en 6 grupos de tres animales cada uno. En el día 0, los grupos 1 al 5 recibieron el compuesto a las dosis de 12, 36, 60, 120 y 180 mg/kg/p.o., respectivamente. El grupo 6 sirvió como testigo sin tratamiento. Posteriormente se obtuvieron muestras sanguíneas y suero de cada animal a las 0, 4, 8, 16, 32, 128 y 720 horas después del tratamiento. Los parámetros bioquímicos analizados fueron AST, GGT, DHL, glucosa, proteína total, albúminas, globulinas, bilirrubina, creatinina, nitrógeno ureico, ácido úrico, colesterol total, fosfatasa alcalina, fósforo. Los análisis de Biometría hemática fueron hematocrito, hemoglobina, eritrocitos, VGM, CHGM, plaquetas, leucocitos totales, neutrófilos segmentados, neutrófilos en banda, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos. En lo referente a Constantes Fisiológicas se midió la temperatura rectal, frecuencia respiratoria, frecuencia cardíaca y movimientos ruminales. Los resultados obtenidos fueron sometidos a un Análisis de Varianza para determinar posibles diferencias significativas ($P < 0.05$), cuando las hubo, estas fueron analizadas mediante la prueba de Tukey. Los resultados indicaron que no hubo diferencias entre los parámetros evaluados cuando fueron comparados con los valores de referencia, reportados en la literatura, excepto en el grupo tratado con 15 veces la dosis clínica recomendada

($P < 0.05$). Con respecto a los indicadores de las constantes fisiológicas, no se determinaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre las variables ni tampoco entre los intervalos de tiempo en los muestreos entre grupos, excepto en la frecuencia respiratoria y frecuencia cardiaca en el grupo tratado con 180 miligramos ($P < 0,05$). Se concluye que la DMT del compuesto Alfa para los bovinos fue de 180 mg/kg/p.o, correspondiendo a un IS de 15 veces la dosis clínica recomendada para bovinos.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de estudios de toxicidad dirigidos a identificar aquellas sustancias que puedan causar daño a los organismos tratados, juegan un papel muy importante en la producción pecuaria.

Por otro lado, un aspecto relevante para la selección del medicamento es la tolerancia del sujeto de tratamiento a un fármaco, a través de la determinación del Índice o Margen de Seguridad (IS) que este presenta (Sumano y Ocampo, 1997; Botana *et al*, 2002). Adicionalmente, la guía de seguridad de nuevas drogas para animales (1989) menciona que la Dosis Máxima Tolerada (DMT) es igual a la determinación del número máximo de dosis que se pueden administrar sin que los bovinos muestren sintomatología adversa y esto se divide entre la dosis recomendada que equivale al IS.

Asimismo, Clark *et al* (1990), señalan que el concepto de efectividad en relación con la toxicidad, (IS) es mas importante que cualquier relación específica.

Con relación a la determinación de constantes fisiológicas, estas son llevadas a cabo con el propósito de determinar cualquier anomalía que pueda ser relacionada con el fármaco utilizado. Estos exámenes pueden ser numerosos y dentro de los más relevantes se pueden citar a la temperatura corporal, frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria así como los movimientos ruminales. (Guideline 33, 1989). De ahí que la evaluación de estos parámetros refuerza

considerablemente los estudios que se llevan a cabo para estimar el grado de tolerancia de los animales hacia un determinado fármaco.

El conocimiento de la temperatura corporal es de gran interés clínico diagnóstico, ya que en numerosas enfermedades orgánicas se presentan desviaciones de la misma tanto en sentido superior como inferior, lo cual da una idea muy valiosa de la gravedad de la enfermedad así como de la fuerza de la reacción defensiva del organismo (Gurtler et al, 1987). Por otro lado, existen otras condiciones capaces de causar variaciones normales en la temperatura corporal de los sujetos experimentales tales como la edad, el sexo, la estación, la hora del día, la temperatura ambiental, el ejercicio, la ingestión de alimentos, la digestión y la ingestión de agua entre otros (Andersson y Hallgrimur, 1999).

Un excelente indicador del estado de salud es la frecuencia respiratoria y se refiere al número de ciclos o de respiraciones por minuto. Además de las variaciones observadas entre especies, la frecuencia puede ser afectada por el tamaño corporal, la edad, el ejercicio, la excitación, la temperatura ambiente, la preñez, el grado de distensión del conducto digestivo y el estado de salud.

En todos los animales domésticos la frecuencia respiratoria aumenta continuamente conforme la temperatura ambiente se incrementa, con lo cual se ayuda a la termorregulación. Esta constante fisiológica aumenta generalmente durante la enfermedad y disminuye sólo en raras ocasiones, lo cual permite que sea un indicador útil del estado de salud (Reece, 1999).

Se le designa como frecuencia cardíaca al número de ciclos cardíacos que se producen por minuto; el cual es distinto según la especie animal de que se trate. Los animales de pequeña talla tienen generalmente una frecuencia cardíaca notablemente más elevada que los animales corpulentos, lo cual está en correlación con la intensidad de los procesos metabólicos. Un incremento notable

de esta frecuencia se designa con el nombre de taquicardia y su disminución se denomina bradicardia. Existen factores que influyen sobre la frecuencia cardiaca como la corpulencia del animal; la edad del animal; el trabajo realizado; la carga metabólica del animal; las temperaturas corporal y ambiental; la administración intravenosa de soluciones y la alimentación (Gürtler et al, 1987).

La rumia o masticación del bolo de la rumia es una característica especial de los rumiantes y particularmente del ganado vacuno, que pacen alimento áspero e ingieren forraje abundante. Esta se presenta en aproximadamente 10 episodios principales que ocupan hasta 10 horas al día. La frecuencia de la rumia tiene un ciclo circadiano y de manera común se asocia principalmente con el estado de somnolencia; la frecuencia es mayor durante la tarde y a medianoche.

La rumia es uno de los signos fundamentales y más evidentes de salud. La ausencia de rumia indica anormalidad, excepto cuando animales normales se alimentan con alimentos deficientes en fibra de longitud adecuada. Está ausente en situaciones que causan estrés y en aquellas enfermedades en las que: 1) el animal no ha ingerido alimento por un día o más, 2) la motilidad reticuloruminal es subnormal o 3) hay fiebre (Leek, 1999).

El tiempo utilizado por un solo animal en rumiar depende de la textura del alimento y la cantidad de alimento ingerido.

Los bovinos pueden rumiar de 35 a 80 minutos por kilogramo de forraje consumido y hacen dos tercios de rumia en la noche, cuando se favorece por el descanso, recumbencia y somnolencia.

Un ciclo de rumia incluye cuatro etapas de actividad: regurgitación del bolo semilíquido desde el rumenretículo, su remasticación y reinsalivación simultánea y redegulación de los bolos remasticados finamente.

La frecuencia y duración de la masticación en la rumia se controlan por la textura y cantidad del alimento (Ruckebusch, 1994).

El número de contracciones de la panza en 5 minutos, es de 7 a 12 para el buey, sin embargo también depende de varios factores como: la prehensión de alimentos y la rumiación; el estado de repleción y la presión interna de la panza; el nivel de la glucemia, el pH del contenido de la panza, la acumulación de cuerpos extraños en la redecilla (Gürtler, 1987).

ANTECEDENTES

Los fasciolicidas existentes en el mercado mundial tienen un Índice de seguridad generalmente reducido. Por ejemplo Clorsulon® presenta un índice de 5, Niclofolán® 3, Diamfenetida® 3.3, Nitroxinil® 4, Closantel® 4, Rafoxanida® 6 y solamente el Triclabendazol® presenta un índice de seguridad para bovinos de 20 veces la dosis clínica recomendada (Fairweather y Boray, 1999).

Una forma complementaria de valorar si existe o no toxicidad al administrar un fármaco en un organismo, es determinando las posibles alteraciones en la condición clínica del animal, estimado a través de estudios sobre la química sanguínea, hematología, constantes fisiológicas e indicadores enzimáticos (Vengust *et al*, 2003).

La determinación de enzimas es una técnica sensible al daño ocasionado en las células hepáticas cuando existen problemas de fasciolosis. (Anderson *et al*, 1977). Braun *et al*, (1983) y Bulgin *et al*, (1984) señalan que en animales domésticos la gama glutamil transferasa (GGT) es relativamente alta en bovinos y sus valores de referencia en plasma pueden ayudar a interpretar sus variaciones en el suero en enfermedades hepatobiliares en el ganado.

Qian *et al*, (1998), mencionan que la alteración de las enzimas puede representar una herramienta significativa para el diagnóstico y prevención de enfermedades en los animales. A este respecto existe un considerable número de reportes que muestran evaluaciones sobre niveles en plasma de la aspartato amino transferasa (AST), la gama glutamil transpeptidasa (GGT) y la glutamato deshidrogenasa (GLDH) las cuales pueden ser usadas como marcadores de infección por *Fasciola hepatica* (Sykes *et al*, 1980; Bulgin *et al* 1984; Elsheik *et al*, 1992). Asimismo la determinación de AST y GLDH provee información sobre el paso de fasciolas jóvenes a través del parénquima hepático, mientras que el aumento de la GGT indica penetración de las fasciolas en los conductos biliares (Galtier *et al*, 1986; Sykes *et al*, 1980; Ferre *et al*, 1994, 1995^a, 1996, 1997).

Di Michele de Rosa (1978) señala que en la literatura científica existe amplia información acerca de las concentraciones de los principales constituyentes sanguíneos en animales de importancia económica, especialmente en bovinos. Esta información refiere a variables como proteínas séricas, nitrógeno ureico y creatinina.

Hawkins (1984) describe la relevancia de determinar la hemoglobina y volúmenes de paquetes celulares como indicadores del desarrollo de fasciolosis.

Ogunrinade y Bamgboye (1980) correlacionan conteos de fasciolas con análisis hematológicos en donde estiman volúmenes de paquetes celulares, hemoglobina y conteos de glóbulos rojos en bovinos. Sus resultados indican que el grado de anemia va relacionado con la intensidad de la infección.

Jemli *et al*, (1993) utilizando corderos infectados experimentalmente con *Fasciola hepatica*, realizaron análisis de hematocrito, hemoglobinemia, glóbulos rojos, glóbulos blancos, linfocitos, monocitos, basófilos y neutrófilos. Los autores mencionan que no encontraron diferencias significativas en ninguno de los análisis realizados.

Considerando la alta eficacia fasciolicida mostrada por el compuesto Alfa tanto en ovinos como en bovinos, se manifiesta importante incurrir en aspectos de toxicidad, y para ello, se requiere incidir en estudios relacionados con la tolerancia de los bovinos al fármaco así como en la determinación de su Índice de Seguridad.

OBJETIVOS

1. Determinar la Dosis Máxima Tolerada (DMT) y el Índice de Seguridad (IS) del compuesto Alfa en bovinos.
2. Determinar la posible presencia de efectos adversos, a través del análisis de química sanguínea y la medición de los valores hematológicos así como constantes fisiológicas de los bovinos tratados con el compuesto Alfa.

MATERIAL Y METODOS

Localización del estudio.- La etapa experimental se realizó en las instalaciones del rancho "G-B" localizado en Querétaro, Qro., mientras que el análisis bioquímico y hematológico del suero sanguíneo se realizó en los laboratorios de Patología y Parasitología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Desarrollo del experimento.- Se utilizaron 18 toretes machos entre 200 y 300 kg de peso, los cuales fueron distribuidos en seis grupos de tres animales cada uno. En el día 0 los grupos 1 al 5 recibieron por vía oral una dosis única de 12, 36, 60, 120 y 180 mg/Kg del compuesto Alfa el cual fue administrado en suspensión al 10%, respectivamente. El grupo 6 sirvió como testigo sin tratamiento.

Toma de muestras.- A todos los sujetos experimentales se les tomaron dobles muestras de sangre de la vena caudal utilizando tubos vacutainer de 5 ml de

capacidad, sin anticoagulante y con anticoagulante (heparina), en intervalos de tiempo de 0, 4, 8, 16, 32, 128 y 720 horas postratamiento. Las muestras sanguíneas se dejaban a temperatura ambiente (15 a 20°C) durante 10 a 15 minutos y seguidamente fueron puestas en refrigeración en un lapso menor a una hora para ser centrifugadas a 2800 x g durante 10 minutos. Posteriormente, se separó el plasma depositándolo en viales de 2 ml de capacidad, para almacenarlo a -70°C hasta su utilización para la determinación de los análisis bioquímicos y hematológicos.

Estimación de la Dosis Máxima Tolerada y del Índice de Seguridad.- Se obtuvieron utilizando la fórmula reportada en la guía de pruebas de tolerancia a compuestos emitida por la FDA, en donde:

$$\text{Índice de Seguridad} = \frac{\text{DMT}}{\text{Dosis Clínica}}$$

(Target animal safety guidelines for new animal drugs, 1989).

Parámetros bioquímicos.- Los analitos evaluados fueron: Glucosa, nitrógeno ureico, ácido úrico, creatinina, proteínas totales (PT), albúmina, globulinas, fósforo, bilirrubina total, colesterol total y las actividades enzimáticas de deshidrogenasa láctica (DHL), aspartato-aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (FA), gama glutamil transferasa (GGT). Todos fueron determinados con ayuda de un analizador bioquímico (Analizador Cobas Mira, S® Roche, Switzerland).

Biometrias hemáticas.- Las muestras de sangre fueron analizadas en un periodo menor a 24 horas, utilizando equipo hematológico estándar, y se determinaron los siguientes parámetros: Eritrocitos, leucocitos, concentración de hemoglobina (Hb), volumen del paquete celular (VPC) y la media del volumen celular (MVC); las

determinaciones se realizaron con un equipo Coulter counter ZF₆ (Coulter Electronics, UK). Los conteos diferenciales de leucocitos, como los Neutrofilos (Ne), Eosinofilos (Eo), Basófilos (Ba), Linfocitos (Li), Neutrofilos en banda (Nb) y Monocitos (Mo) fueron determinados y calculados microscópicamente a través de frotis sanguíneos.

Los métodos utilizados para evaluar los diferentes analitos se muestran en el Apéndice No 1.

Constantes fisiológicas.- Se realizó una exploración clínica general de los bovinos, basado en la toma de Temperatura rectal (TR), Frecuencia cardiaca (FR), Frecuencia respiratoria (FC) y Movimientos ruminales (MR). Así mismo, se registro cualquier conducta que pareciera anormal (fotofobia, congestión prurito, cambios en la pupila, incoordinación, cólicos, salivación, nerviosismo, convulsiones, etc.) en los animales tratados durante el transcurso del experimento

En caso de que algún animal feneciera, se tenía previsto realizar la necropsia, y el examen de diferentes órganos, tales como glándula pituitaria, tiroides, páncreas, próstata, riñón, bazo, hígado, corazón, cerebro. Importa aclarar que no hubo decesos de los animales en estudio.

Análisis estadístico.- Para estimar si había diferencias entre las variables analizadas, por tratamiento y por la hora de evaluación, la información obtenida fue sometida a un análisis de varianza. Si las diferencias resultaban significativas ($P < 0.05$), se procedió a utilizar la prueba de Tukey para determinar entre que pares de tratamientos y en que tiempo, de acuerdo con Montgomery (1984). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico S.A.S. (1990).

RESULTADOS

Dosis Máxima Tolerada (DMT) e Índice de Seguridad (IS).-

Los bovinos de los grupos del 1 al 4, tratados con las dosis de 12, 36, 60 y 120 mg/kg de peso, respectivamente, presentaron una respuesta similar y no mostraron síntomas clínicos que indicaran daño por la aplicación del compuesto Alfa.

Por el contrario, los bovinos del grupo 5, tratados con la dosis de 180 mg/kg de peso, fueron los únicos que presentaron una respuesta fuera del patrón general, ya que se observaron nerviosos, con ligera salivación y un ligero temblor corporal. Es importante mencionar que todos ellos volvieron a la normalidad entre 2 y 3 horas, después del tratamiento.

Considerando lo anteriormente mencionado, se puede señalar que la DMT del compuesto Alfa para los bovinos es de 180 mg/kg correspondiendo a un IS de 15 veces la dosis clínica recomendada.

Parámetros bioquímicos

La distribución de los analitos analizados se pueden observar en las Figuras 5.1.1 y 5.1.2., donde se enfatiza la variación de la respuesta de los parámetros bioquímicos del suero de los bovinos para cada uno de los siete tiempos que se evaluaron.

En general, no se observó ningún patrón que indique si alguna dosis ocasionó una respuesta diferente. En todo caso, la respuesta de los bovinos tratados con la dosis de 180 mg/kg presentaron en la mayor parte de las estimaciones una respuesta diferente.

El análisis de varianza que se aplicó para cada hora que se evaluaron los analitos, indicó que en la mayor parte de las variables analizadas no se determinaron diferencias significativas ($P > 0.05$), a excepción de:

Glucosa

En el tiempo inicial se determinaron diferencias entre la máxima concentración y las dosis de 60 y 120 mg/kg ($P < 0.03$). A las 4 horas, se determinaron diferencias entre las dosis de 12 y 120 mg/kg con respecto a la dosis de 180 mg/kg ($P < 0.01$). Finalmente, a las 16 horas se determinaron diferencias entre el testigo y la dosis de 180 mg/kg ($P < 0.04$).

AST

En el tiempo inicial se determinaron diferencias entre el grupo testigo y la dosis de 36 mg/kg ($P < 0.04$).

Fosfatasa alcalina

En el tiempo inicial se determinaron diferencias entre la máxima concentración y las dosis de 12 y 60 mg/kg ($P < 0.03$). A las 4, 8 y 32 horas, se determinaron diferencias entre todas dosis y la máxima concentración ($P < 0.03$).

Los analitos analizados para cada una de las dosis del compuesto Alfa se describen en el Cuadro 5.1., donde se enfatiza la variación de la respuesta de los parámetros bioquímicos para cada una de las seis dosis que se administraron a los bovinos de los grupos experimentales.

En términos generales, se obtuvieron valores similares, sin embargo, al analizar la respuesta de los analitos durante el transcurso de la evaluación se determinaron diferencias significativas, en las dosis de:

0 mg/kg (testigo), únicamente con el analito DHL, entre los tiempos de 4, 8 y 16 h, con respecto al tiempo de 720 h ($P < 0.03$).

12 mg/kg, con las globulinas y la enzima DHL, en el primer caso difieren el tiempo inicial y el final ($P < 0.04$), en el segundo caso difieren entre las 32 h con respecto a la evaluación de las 4 y 128 h ($P < 0.03$).

36 mg/kg, con la DHL y la creatinina, en el primer caso difieren el tiempo final con respecto a la evaluación de los tiempos de las 4, 8, 16 y 32 h ($P < 0.05$), en el segundo caso difieren entre las 16 h con respecto a la evaluación de las 8 y 128 h ($P < 0.05$).

60 mg/kg, con las proteínas totales, el colesterol total y la fosfatasa, en el primer caso difieren entre la evaluación de la 4 y 8 h ($P < 0.05$), en el segundo caso difieren entre las 32 h con respecto a la evaluación inicial y las 8 h ($P < 0.04$), en el tercer caso difieren entre la evaluación de las 128 y 720 h ($P < 0.04$).

120 mg/kg, con la DHL, creatinina y el colesterol total, en el primer caso difieren el tiempo final con respecto a la evaluación de los tiempos 0, 4, 16 y 128 h ($P < 0.03$), en el segundo caso también difiere el tiempo final con respecto a la evaluación de los tiempos de las 8, 32 y 128 h ($P < 0.05$), en el tercer caso difieren entre las 32 h con respecto a la evaluación inicial y las 8 h ($P < 0.02$).

180 mg/kg, el único analito en que se determinaron diferencias fue el de DHL, difiriendo el tiempo final con respecto a la evaluación inicial y a las 128 h ($P < 0.04$), también se determinaron diferencias entre las 16 y 128 h ($P < 0.05$).

Parámetros hematológicos

La distribución de los parámetros de la fórmula roja y blanca se observan en las Figuras 5.2.1 y 5.2.2., al igual que los parámetros bioquímicos, se enfatiza la variación de la respuesta para cada uno de los siete tiempos que se evaluaron.

Como se esperaba, no se observó ningún patrón que indique si alguna dosis ocasiono una respuesta diferente. El análisis de varianza que se empleó para cada hora que se realizó la evaluación de los parámetros hematológicos, indicó que en la mayor parte de las variables analizadas no se determinaron diferencias significativas ($P > 0.05$), a excepción de dos parámetros:

Plaquetas

En el tiempo inicial se determinaron diferencias entre las dosis de 12 y 60 mg/kg ($P < 0.02$). A las 8 horas, se determinaron diferencias entre el testigo y la dosis de 120 mg/kg ($P < 0.02$), también se determinaron diferencias entre la dosis de 36 mg/kg con respecto a las dosis de 12 y 120 mg/kg ($P < 0.04$). A las 32 horas, se determinaron diferencias entre la dosis de 36 mg/kg con respecto a las dosis de 12 y 120 mg/kg ($P < 0.04$). A las 720 horas, se determinaron diferencias entre la dosis de 36 mg/kg con respecto al testigo y las dosis de 12 y 180 mg/kg ($P < 0.05$), también se determinaron diferencias entre el testigo y la dosis de 60 mg/kg ($P < 0.04$).

Neutrofilos

A las 128 horas, se determinaron diferencias significativas entre las dosis de 60 y 120 mg/kg ($P < 0.04$).

Los parámetros de la fórmula roja y blanca registrados fueron parecidos a los valores estándares de referencia y la respuesta de los bovinos para cada tratamiento se describe en el Cuadro 5.2., donde se enfatiza la variación de la respuesta de los parámetros hematológicos para cada una de las seis dosis que se administraron a los bovinos de los grupos experimentales.

En términos generales, los resultados que se obtuvieron fueron similares entre los distintos tiempos de evaluación, a excepción de:

0 mg/kg (testigo), únicamente difieren las estimaciones de las plaquetas, entre la evaluación de las 128 h y el tiempo final ($P < 0.05$).

12 mg/kg, continúan difiriendo las plaquetas, entre el tiempo inicial con respecto a la evaluación de las 4 y 16 h ($P < 0.02$).

36 mg/kg, ningún parámetro presento diferencias significativas ($P > 0.05$).

60 mg/kg, con la hemoglobina, los leucocitos y los linfocitos, en el primer caso difieren entre la evaluación de las 16 h con respecto a las evaluaciones de las 128 y 720 h ($P < 0.05$), en el segundo caso difieren entre las 32 h con respecto a la evaluación inicial y las 16 h ($P < 0.04$), en el tercer caso difieren entre la evaluación inicial con respecto a las 128 y 720 h ($P < 0.05$), al igual que entre las evaluaciones de las 8 y 32 h ($P < 0.02$).

120 mg/kg, difieren las estimaciones de las plaquetas, entre la evaluación de las 32 h y el tiempo final ($P < 0.05$).

180 mg/kg, el único parámetro en que se determinaron diferencias fue en los leucocitos, entre la evaluación de las 16 h con respecto a la evaluación del tiempo 0, 4, 8 y 128 ($P < 0.02$).

Parámetros fisiológicos

La distribución de la respuesta fisiológica de los bovinos tratados con el compuesto Alfa se describe en la Figura 5.3., enfatizando, al igual que con los parámetros anteriores, los cambios que se presentaron para cada uno de los siete tiempos en que se evaluaron.

En general, la respuesta de los bovinos tratados con las dosis entre 12 y 120 mg/kg es similar al grupo testigo, mientras que la respuesta de los bovinos tratados con la dosis de 180 mg/kg difiere en la mayor parte de las estimaciones. El análisis de varianza que se empleó entre los tratamientos para cada hora de evaluación, indica:

Frecuencia respiratoria

En los tiempos de evaluación de las 0, 4, 16, 32 y 720 h se determinaron diferencias entre la máxima concentración y todas las dosis, incluyendo al testigo, ($P < 0.02$). A las 8 horas, se determinaron diferencias entre la máxima dosis con respecto a la dosis de 12 y 60 mg/kg ($P < 0.05$). La evaluación de las 128 h fue el único tiempo en que no se determinaron diferencias significativas ($P > 0.05$).

Frecuencia cardiaca

En los tiempos de evaluación de las 4, 16, y 720 h se determinaron diferencias entre la máxima concentración y todas las dosis, incluyendo al testigo, ($P < 0.04$). A las 128 horas, se determinaron diferencias entre la máxima dosis con respecto a la dosis de 60 y 120 mg/kg ($P < 0.04$). Las evaluaciones de las 0, 8 y 32 h fueron los tiempos que no se determinaron diferencias significativas ($P > 0.05$).

Temperatura

A las 128 horas, se determinaron diferencias entre la máxima dosis con respecto al testigo y las dosis de 12 y 36 mg/kg ($P < 0.05$).

Movimientos ruminales

Fue el único parámetro en que no se detectaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en el transcurso de la evaluación.

La respuesta fisiológica de los toretes sometidos a los tratamientos del compuesto Alfa, se describe en el Cuadro 5.3., enfatizando, al igual que con los parámetros anteriores, la respuesta de los grupos experimentales a la aplicación de las seis dosis que se aplicaron.

Los parámetros fisiológicos que presentaron la mayor variabilidad durante el transcurso de la evaluación estimándose diferencias significativas en las dosis de:

0 mg/kg (testigo), únicamente difieren las estimaciones de la frecuencia cardiaca, entre los tiempos de 0, 8 y 32 h, con respecto al tiempo de 720 h ($P < 0.03$).

12 mg/kg, ningún parámetro presento diferencias significativas ($P > 0.05$).

36 mg/kg, nuevamente en la frecuencia cardiaca se determinaron diferencias significativas entre la evaluación de las 720 h y todos los tiempos restantes ($P < 0.05$).

60 mg/kg, con la temperatura y la frecuencia cardiaca de los bovinos, en el primer caso difiere la evaluación de las 720 h con respecto a la evaluación de las 8 y 16 h ($P < 0.05$), en el segundo caso difieren la evaluación de las 720 h y todos los tiempos restantes ($P < 0.01$), así como la evaluación de las 36 h con respecto a el tiempo de las 0, 4 y 128 h ($P < 0.02$), al igual que de las 16 h con respecto a las evaluaciones de la 0 y 4h ($P < 0.02$).

120 mg/kg, únicamente difiere la frecuencia cardiaca, entre la evaluación de las 720 h y todos los tiempos restantes ($P < 0.01$), así como la evaluación inicial con respecto a el tiempo de las 8, 16 y 32 h ($P < 0.05$), al igual que la evaluación de las 32 h con respecto a las evaluaciones de la 4 y 128 h ($P < 0.05$).

180 mg/kg, la frecuencia cardiaca y la frecuencia respiratoria coinciden, ya que el análisis indico diferencias significativas en la evaluación de las 4 h con respecto a todos los tiempos ($P < 0.02$).

DISCUSION

Los fasciolicidas existentes en el mercado tienen un reducido Índice de seguridad con rangos que van desde 4 a 6 veces la dosis recomendada (Fairweather, 1999). Solo triclabendazol tiene un amplio margen de seguridad el cual en bovinos es de 20 veces la dosis recomendada (Boray, 1983). Asimismo se reporta que consecuentemente a la aplicación del triclabendazol se pueden presentar

reacciones en piel por fotosensibilidad, lo cual se manifiesta por inflamación de la piel y de la ubre (Sumano y Ocampo, 1997).

Es importante aclarar que ninguno de estos síntomas fue observado al utilizar el tratamiento con diferentes dosis del compuesto Alfa.

Considerando que el compuesto Alfa es también un derivado bencimidazolico, era de esperarse que tuviera un amplio margen de seguridad demostrando de hecho que este puede ser administrado por vía oral a dosis más altas que la clínicamente recomendada.

En apoyo a lo mencionado anteriormente Ayala (2003), administró el compuesto Alfa una dosis de 12 mg/kg/ per os a 4 grupos de 6 vacas gestantes. La gestación era a niveles de 2, 3, 6 y 9 meses respectivamente y no se observaron abortos ni alteraciones clínicas cuando se compararon con grupos similares de vacas gestantes no tratadas y no gestantes no tratadas. El estudio finalizó con la observación y monitoreo durante un mes de las madres y de los becerros(as) recién nacidos los cuales mostraron un comportamiento normal.

Con relación a la evaluación de los parámetros bioquímicos, se ha puesto mucho énfasis en la aplicación de enzimas plasmáticas como marcadores de daño de algún órgano. Evans (1996) mencionó que la distribución de enzimas en los diferentes tejidos varía entre especies y puede ser afectada por edad, sexo así como muchos otros factores. En nuestro estudio se observó gran similitud entre ellas y aun cuando algunos analitos fueron determinados como estadísticamente diferentes, estos son irrelevantes en virtud de encontrarse cercanos a los valores de referencia.

De manera similar, las determinaciones de glóbulos blancos y rojos mostraron ser muy parecidos a los valores obtenidos en el grupo control. En virtud de la gran

cantidad de muestras analizadas se consideró como aceptable el encontrar algunas veces algún parámetro alterado como es el caso de las plaquetas, las cuales fueron ligeramente diferentes a los valores normales. De hecho la literatura proporciona amplia información acerca de los principales parámetros hematológicos especialmente en bovinos y nuestros datos están en concordancia con los valores reportados por estos autores (Bossaert, 1999; Di Michelle de Rosa, 1978 y Slanac, 2002)

Como se mencionó anteriormente estas ligeras diferencias no provocaron reacciones adversas en los animales aun con la dosis más alta administrada.

En lo referente a las constantes fisiológicas, aun cuando los valores de frecuencia respiratoria obtenidos mostraron diferencias en los bovinos, estos datos no reflejaron serias alteraciones en el comportamiento y salud de los animales. Es importante hacer notar que los bovinos recuperaron sus valores normales de frecuencia cardiaca en solo unas horas.

Una situación similar se observó con la frecuencia respiratoria la cual se alteró únicamente cuando se administró la dosis más alta.

De manera general el comportamiento normal de los diferentes analitos y el no aumento o decremento de las enzimas analizadas sugiere la ausencia de desordenes metabólicos.

No obstante es relevante señalar que la dosis de 180 mg/kg provee un margen de seguridad que es por mucho, más amplio que el de la mayoría de los fasciolicidas comerciales.

La información aquí reportada es relevante desde que muestra evidencia de la gran seguridad de este fasciolicida experimental indicado para la terapia de fasciolosis en bovinos.

CONCLUSION

Se concluye que la máxima dosis tolerada para el compuesto alfa en bovinos es de 180 mg/kg/po lo cual corresponde a un índice de seguridad de 15 veces la dosis clínica recomendada.

REFERENCIAS

- Anderson PH, Berrett S, Brush JP, Hebert N, Parfitt JW, Patterson DSP. Biochemical indicators of liver injury in calves with experimental fascioliasis. *Vet Rec* 1977; 100: 43-45.
- Andersson BE, Jónasson H. Regulación de la temperatura y fisiología ambiental. In: Swenson MJ, Reece WO compiladores. *Fisiología de los animales domesticos de Dukes Tomo 2.* México: UTEHA, 1999: 886-895.
- Ayala AS. Evaluación toxicológica del compuesto fasciolicida "Alfa" en vacas gestantes (tesis de maestria). México (D.F.): Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 2002.
- Bossaert K., Lonneux J.F., Godeau J.M., Peeters J., Losson B, Serological and biochemical follow-up in cattle naturally infected with *Fasciola hepatica*, and comparison with a climate model for predicting risks of fasciolosis, *Vet. Res.* 30 (1999) 615-628.
- Botana LM, Landoni F, Martín-Jimenez T. *Farmacología y Terapeutica Veterinaria.* Mc Graw-Hill Interamericana, Madrid. 2002.
- Boray, J.C., Crowfoot, P.D., Strong, M.B., Allison, J.R., Schellenbaum, M., Orelli von M. and Sarasin, G. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* in sheep with triclabendazole. *Vet Rec* 1983;113: 315-317

- Braun JP, Bénard P, Burgat V, Rico AG. Gamma glutamyl transferase in domestic animals. *Vet Res Comm* 1983; 6:77-90.
- Bulgin MS, Anderson BC. Serum gamma glutamyl transpeptidase activity with induced fascioliasis. *Res Vet Sci* 1984; 37: 167-171.
- Clark NG, Craig BP, Johnson AR. *Farmacología Clínica. Seguridad y efectividad de los fármacos*. 12ª ed. México: Panamericana, 1990.
- Di Michele de Rosa S, Otaiza VE, Valeri SH. Valores hematológicos y de la química sanguínea en bovinos de los estados Carabobo y Guarico III. Proteínas séricas, nitrógeno ureico y creatinina. *Agronomía Tropical* 1978; 28(3): 233-248.
- Elsheik HA, Ali BH, Homeida AM, Lufti AA, Hpke HJ. The effect of fascioliasis on the activities of some drug-metabolizing enzymes in desert sheep liver. *Br Vet J* 1992;148:249-257.
- Evans G.O., *General Enzymology*. In: Evans G.O, ed. *Animal Clinical Chemistry* Great Britain: Taylor & Francis, 1996: 59-70.
- Fairweather I, Boray JC. Mechanisms of fasciolicide action and drug resistance in *Fasciola hepatica*. In: Dalton JP, editor. *Fasciolosis*. London, UK: CABI Publishing, 1999: 225-268.
- Ferre I, Barrio JM, González-Gallego J, Rojo-Vázquez FA. Appetite depresión in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol* 1994; 55: 71-79.
- Ferre I, López P, Gonzalo-Orden M, Julian MD, Rojo FA, González-Gallego J. The effects of subclinical fasciolosis on hepatic secretory function in sheep. *Parasitol Res* 1995a; 81: 127-131.
- Ferre I, López P, Rojo-Vázquez F, González-Gallego J. Experimental ovine fasciolosis: Antipyrine clearance as indicador of liver damage. *Vet Parasitol* 1996; 62: 93-100.
- Ferre I, Ortega-Mora LM, Rojo-Vázquez FA. Serum and bile antibody response (IgG and IgA) during subclinical *Fasciola hepatica* infection sheep. *Vet Parasitol* 1997; 68: 261-267.

- Galtier P, Larrieu G, Tufenkji AE, Franc M. Incidence of experimental fasciolosis on the activity of drug-metabolizing enzymes in lamb liver. *Drug Metab Dispos* 1986; 14: 137-141.
- Galtier P, Coulet M, Sutra JF, Biro-Sauveur B, Alvinerie M. *Fasciola hepatica*: Mebendazole and thiabendazole pharmacokinetics in sheep. *Exp Parasitol* 1994; 79: 166-176.
- Gürtler H, Ketz HA, Kolb E, Schröder L, Seidel H. *Fisiología Veterinaria Vol. I* 3ª reimpresión. Zaragoza (España): Acribia, 1987.
- Gürtler H, Ketz HA, Kolb E, Schröder L, Seidel H. *Fisiología Veterinaria Vol. II* 3ª reimpresión. Zaragoza (España): Acribia, 1987.
- Hawkins CD. The use of haemoglobin, packed-cell volume and serum sorbitol dehydrogenase as indicators of the development of fascioliasis in sheep. *Vet Parasitol* 1984; 15: 125-133.
- Jemli MH, Braun JP, Dorchies P, Romdhane MN, Kilani M. Exploration biochimique et hematologique chez l'agneau infesté expérimentalement par *Fasciola hepática*. *Rec Méd Vét* 1993; 169 (4):241-249.
- Leek BF. Digestión en el estomago de los rumiantes. In: Swenson MJ, Reece WO compiladores. *Fisiología de los animales domesticos de Dukes Tomo 1*. México: UTEHA, 1999: 387-416.
- López P, Tunon MJ, González P, Diez N, Bravo AM, González-Gallego J. Ductular proliferation and hepatic secretory function in experimental fascioliasis. *Exp Parasitol* 1993; 77: 36-42.
- Montgomery D. *Design and análisis of experimental*. 1984. 2nd.ed. William and Sons. Inc. New York 538 p.
- Ogunrinade AF, Bamgboye EA. Bovine fascioliasis in Nigeria. I. Haematological índices and their correlation with Word burden in chronic fascioliasis. *Br Vet J* 1980; 136: 457-462.
- Qian Yang, Wei Hua Mao, Ferre I, Bayón JE, Mao XZ, González-Gallego J. Plasma aspartate aminotransferase (AST), glutamate dehydrogenase (GLDH) and gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) activities in water

- buffaloes with experimental subclinical fasciolosis. *Vet Parasitol* 1998; 78: 129-136.
- Reece WO. Respiración en mamíferos. In: Swenson MJ, Reece WO compiladores. *Fisiología de los animales domesticos de Dukes Tomo 1* México: UTEHA, 1999: 263-293.
- Ruckebusch Y, Phaneuf LP, Dunlop R. Motilidad gastrointestinal en rumiantes. In: *Fisiología de pequeñas y grandes especies*. México: El Manual Moderno, 1994: 291-315.
- Slanac A.L., Balbuena O.N., Scheiner J.M., Koza J.J, Kucseva G.A., Cardoso C.D., Samantha M., Efectos de la suplementación proteica invernal sobre indicadores bioquímicos del estado nutricional y algunas enzimas plasmáticas de vaquillas cruce cebú. *V Ciencias Veterinarias* 030. www.unne.edu.ar/cit/2002/04-Veterinarias/000-uv-indice-web.htm
- Statistical Analysis Systems (SAS), 1990. Institute Inc.:SAS/STAT. User's guide: 4th ed. Cary (NC).
- Sumano-López H. y Ocampo-Camberos L. *Farmacología Veterinaria* 2^a ed. México, D.F: Mc Graw-Hill Interamericana.1997.
- Sykes AR, Coop RL, Robinson MG. Chronic subclinical ovine fasciolosis: Plasma glutamate dehydrogenase, gamma-gluyamyl transpeptidase and aspartate aminotransferase activities and their significance as diagnostic aids. 1980; 28: 71-75.
- Target animal safety guidelines for new animal drugs. Guideline 33. Office of New Animal drug Evaluation Center for Veterinary Medicine Food and drug Administration. U.S Deparment of Health and Human Services, Public Health Service Food and Drug Administration. 1989.
- Vengust G, Klinkon M, Bidovec A, Vengust A. *Fasciola hepatica*: effects on blood constituents and liver minerals in fallow deer (*Dama dama*). *Vet Parasitol* 2003; 112: 51-61.

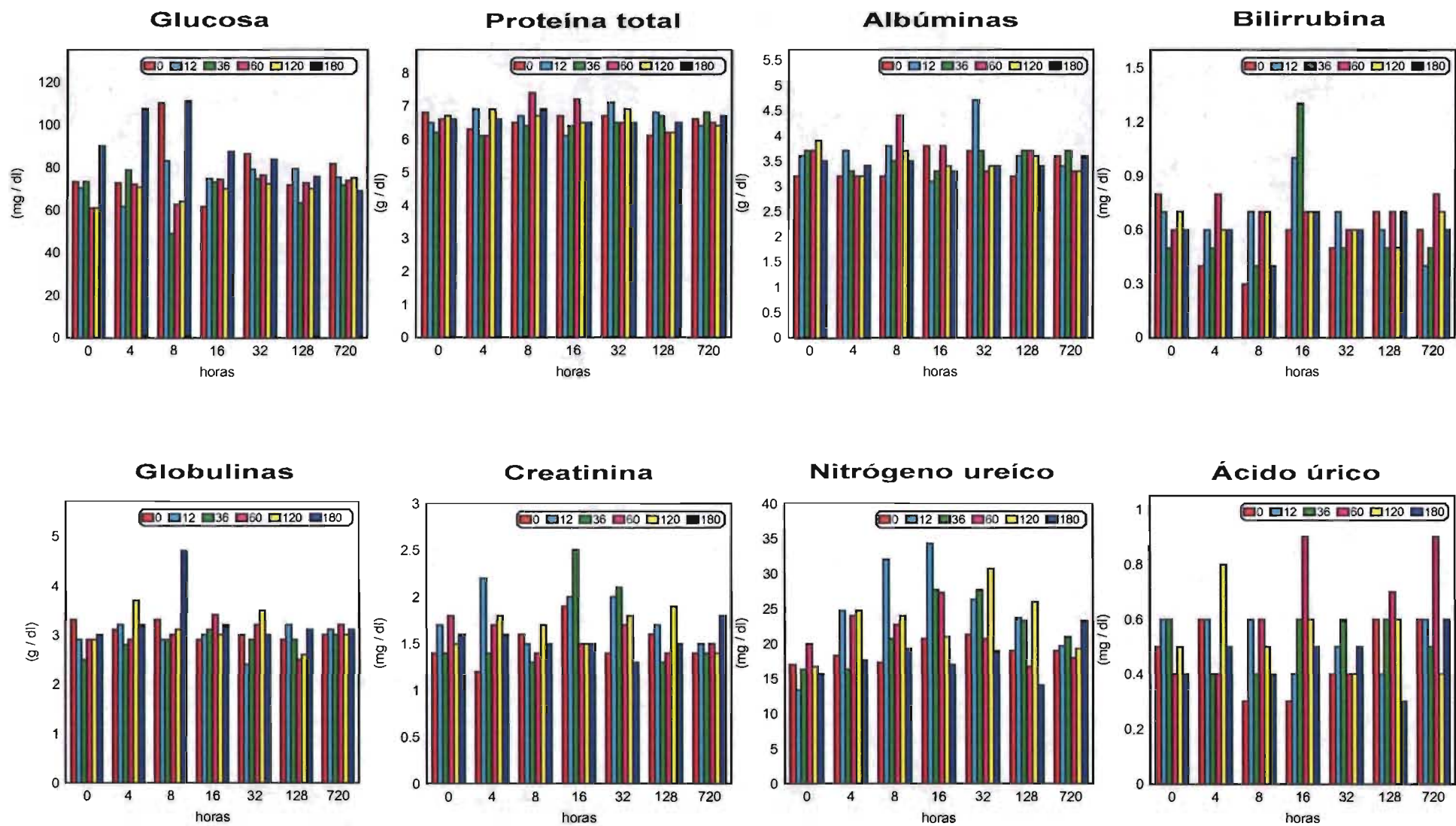


Figura 5.1.1. Comportamiento general de los parámetros bioquímicos de sueros de bovinos tratados a diferentes dosis del compuesto Alfa

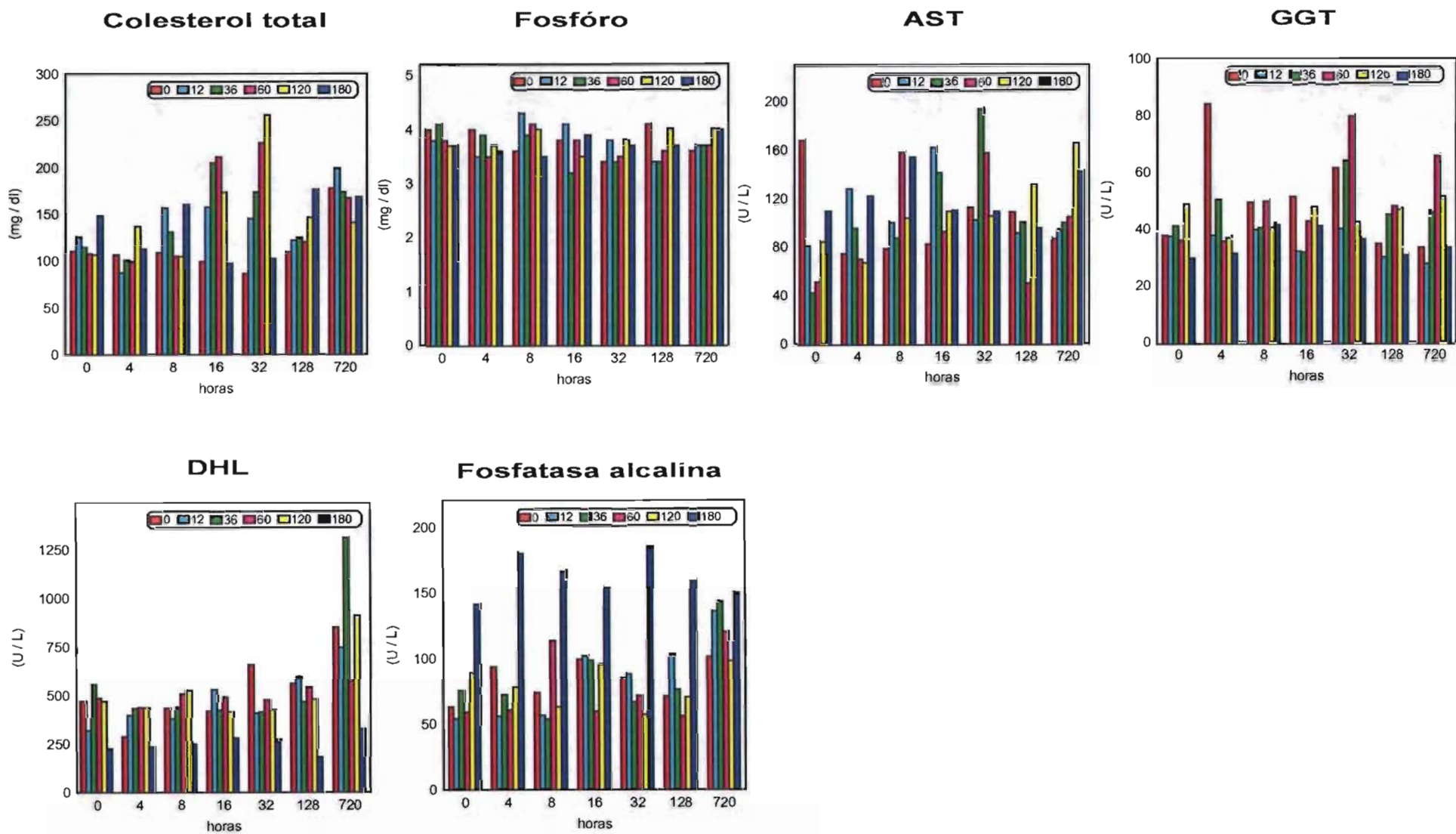


Figura 5.1.2. Comportamiento general de los parámetros bioquímicos de sueros de bovinos tratados a diferentes dosis del compuesto Alfa (continuación)

Cuadro 5.1. Parámetros bioquímicos de sueros de bovinos tratados con diferentes dosis del compuesto Alfa

Analitos	Dosis (mg/kg/per os)											
	0*		12		36		60		120		180	
	**	P	**	P	**	P	**	P	**	P	**	P
Glucosa (mg/dl)	79.6 ± 20.0	0.06	74.8 ± 10.4	0.212	69.1 ± 16.0	0.331	70.4 ± 7.7	0.052	69.0 ± 8.1	0.41	89.1 ± 18.3	0.14
Proteína total (g/dl)	6.5 ± 0.5	0.75	6.6 ± 0.5	0.31	6.4 ± 0.5	0.77	6.7 ± 0.6	0.03	6.6 ± 0.5	0.5	6.6 ± 0.3	0.83
Albúminas (g/dl)	3.4 ± 0.4	0.33	3.7 ± 0.6	0.07	3.6 ± 0.5	0.85	3.6 ± 0.7	0.46	3.5 ± 0.4	0.44	3.5 ± 0.3	0.94
Bilirrubina (mg/dl)	0.5 ± 0.2	0.12	0.7 ± 0.3	0.46	0.6 ± 0.5	0.3	0.7 ± 0.2	0.72	0.6 ± 0.2	0.94	0.6 ± 0.1	0.19
Globulinas (g/dl)	3.1 ± 0.5	0.97	2.9 ± 0.3	0.03	2.9 ± 0.4	0.57	3.0 ± 0.5	0.43	3.1 ± 0.5	0.15	3.3 ± 0.9	0.3
Creatinina (mg/dl)	1.5 ± 0.4	0.22	1.8 ± 0.5	0.53	1.6 ± 0.6	0.03	1.6 ± 0.3	0.7	1.7 ± 0.2	0	1.5 ± 0.3	0.44
Nitrógeno ureico (mg/dl)	19.0 ± 4.2	0.89	24.9 ± 11.9	0.4	21.9 ± 7.1	0.24	21.3 ± 6.2	0.42	23.2 ± 7.3	0.32	18.0 ± 5.7	0.6
Ácido úrico (mg/dl)	0.5 ± 0.3	0.31	0.5 ± 0.2	0.93	0.5 ± 0.3	0.91	0.6 ± 0.3	0.25	0.5 ± 0.2	0.47	0.5 ± 0.2	0.26
Colesterol total (mg/dl)	114.3 ± 41.0	0.14	142.2 ± 61.9	0.5	146.3 ± 53.9	0.16	148.2 ± 61.2	0.01	152.2 ± 62.2	0.02	138.2 ± 46.5	0.14
Fósforo (mg/dl)	3.8 ± 0.5	0.58	3.8 ± 0.4	0.06	3.7 ± 0.5	0.3	3.7 ± 0.4	0.64	3.8 ± 0.5	0.9	3.7 ± 0.4	0.81
AST (U/L)	102.3 ± 46.8	0.16	108.9 ± 47.9	0.46	109.3 ± 80.5	0.43	98.4 ± 58.4	0.05	109.9 ± 48.2	0.27	121.1 ± 34.1	0.39
GGT (U/L)	50.9 ± 27.5	0.01	35.6 ± 16.7	0.97	46.1 ± 20.2	0.68	51.7 ± 22.2	0.11	45.0 ± 19.6	0.98	35.5 ± 6.8	0.13
DHL (U/L)	527.2 ± 210.9	0.01	483 ± 190.3	0.04	577.9 ± 404.0	0.03	502.1 ± 124.5	0.93	523.0 ± 205.8	0.01	253.9 ± 52.2	0
Fosfatasa alcalina (U/L)	84.1 ± 24.7	0.38	85.3 ± 43.9	0.14	84.0 ± 42.2	0.16	77.4 ± 32.3	0.01	78.9 ± 36.2	0.79	163.1 ± 41.3	0.89

* = Testigo, ** = Promedio ± Desviación estandar, P = Probabilidad

Celdas sombreadas indican diferencias significativas (P<0.05)

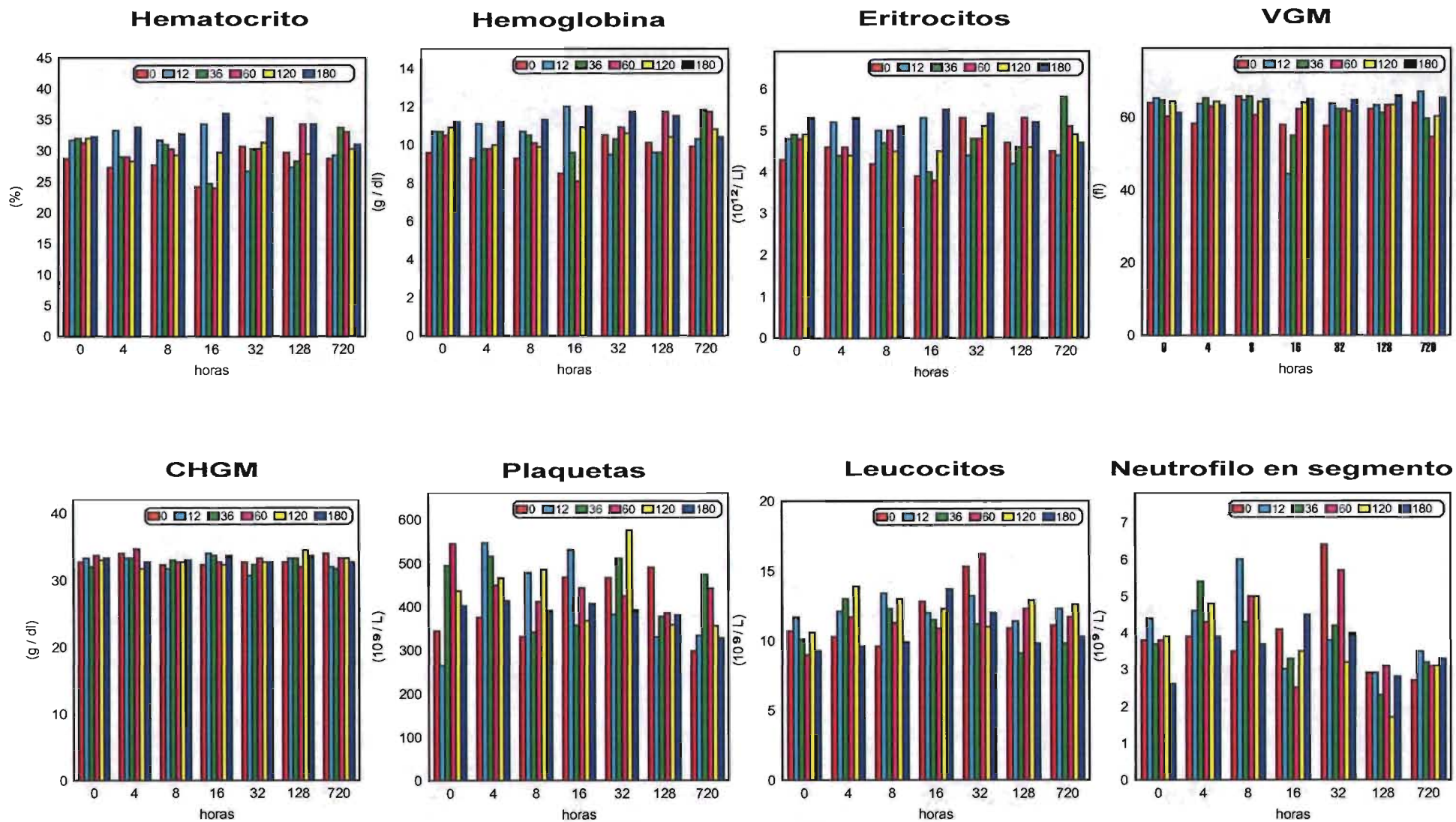


Figura 5.2.1. Comportamiento general de los parámetros hematológicos de sueros de bovinos tratados a diferentes dosis del compuesto Alfa

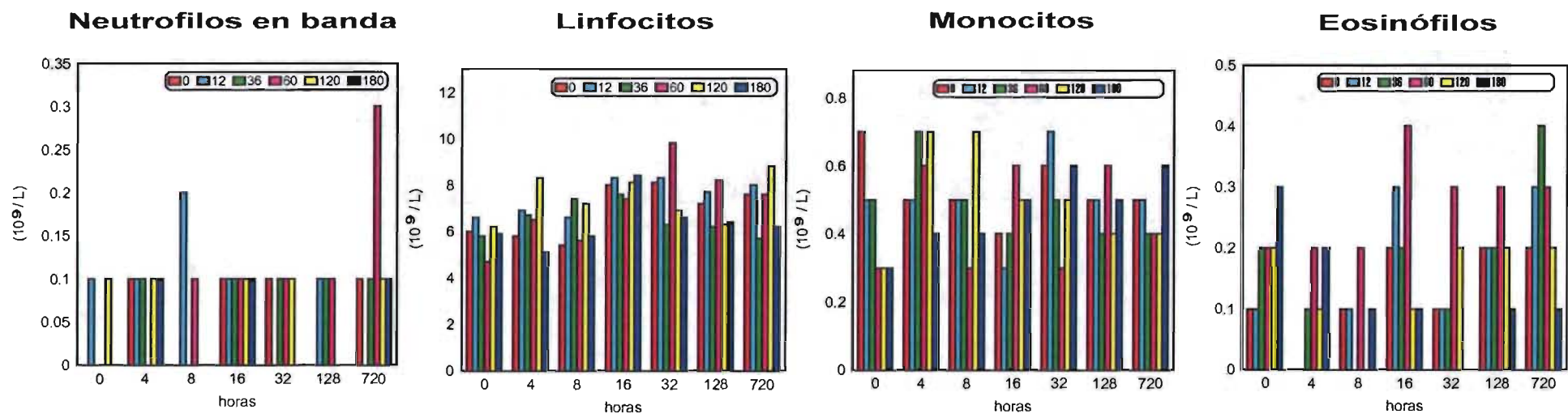


Figura 5.2.2. Comportamiento general de los parámetros hematológicos de sueros de bovinos tratados a diferentes dosis del compuesto Alfa (continuación).

Cuadro 5.2. Parámetros hematológicos de sueros de bovinos tratados con diferentes dosis del compuesto Alfa

Analitos	Dosis (mg/kg/per os)											
	0*		12		36		60		120		180	
	**	P	**	P	**	P	**	P	**	P	**	P
Hematocrito %	28.1 ± 4.6	0.78	30.6 ± 5.03	0.45	29.9 ± 4.3	0.21	30.3 ± 4.5	0.1	30.1 ± 2.7	0.75	33.6 ± 2.5	0.17
Hemoglobina g/dl	9.6 ± 1.4	0.75	10.5 ± 1.7	0.63	10.3 ± 1.6	0.72	10.4 ± 1.6	0.04	10.1 ± 1.2	0.93	11.3 ± 0.8	0.3
Eritrocitos x 10 ¹² /L	4.5 ± 0.7	0.48	4.8 ± 0.8	0.51	4.8 ± 0.8	0.16	4.79 ± 0.7	0.2	4.7 ± 0.6	0.75	5.2 ± 0.4	0.37
VGM fl ***	61.4 ± 5.4	0.34	61.7 ± 13.1	0.43	62.0 ± 5.0	0.08	60.1 ± 7.8	0.9	63.2 ± 3.12	0.65	64.4 ± 3.0	0.6
CHGM g/dl ****	33.0 ± 1.1	0.26	32.6 ± 1.6	0.07	32.8 ± 1.3	0.44	33.2 ± 1.7	0.67	32.8 ± 1.7	0.75	33.1 ± 0.8	0.4
Plaquetas x 10 ⁹ /L	395.9 ± 93.5	0.02	409.1 ± 122.4	0.01	438.4 ± 118.1	0.27	442.7 ± 115.6	0.82	438.6 ± 100.6	0.04	387.7 ± 44.5	0.29
Leucocitos x 10 ⁹ /L	11.5 ± 2.5	0.08	12.3 ± 2.2	0.95	11.0 ± 2.6	0.55	11.9 ± 2.6	0.02	11.7 ± 3.4	0.6	10.7 ± 1.8	0
Neutrofilos segm. x 10 ⁹ /L	3.9 ± 1.8	0.27	4.0 ± 1.8	0.39	3.8 ± 1.5	0.25	4.0 ± 1.6	0.11	3.6 ± 1.5	0.06	3.6 ± 0.9	0.06
Neutrofilos en banda x 10 ⁹ /L	0.07 ± 0.07	0.74	0.1 ± 0.1	0.35	0.07 ± 0.08	0.69	0.1 ± 0.2	0.32	0.2 ± 0.1	0.35	0.1 ± 0.1	0.08
Linfocitos x 10 ⁹ /L	6.9 ± 1.7	0.23	7.5 ± 2.1	0.91	6.5 ± 1.3	0.52	7.1 ± 1.9	0	7.4 ± 2.4	0.82	6.3 ± 1.4	0.06
Monocitos x 10 ⁹ /L	0.5 ± 0.2	0.69	0.5 ± 0.2	0.85	0.5 ± 0.2	0.5	0.4 ± 0.2	0.1	0.5 ± 0.2	0.44	0.5 ± 0.3	0.82
Eosinófilos x 10 ⁹ /L	0.12 ± 0.12	0.65	0.02 ± 0.2	0.4	0.2 ± 0.2	0.64	0.3 ± 0.2	0.95	0.2 ± 0.1	0.57	0.1 ± 0.2	0.56
Basófilos x 10 ⁹ /L	0 ± 0		0 ± 0		0 ± 0		0 ± 0		0 ± 0		0 ± 0	

* = Testigo; ** = Promedio ± Desviación estandar; *** = Volúmen Globular Medio; **** = Concentración de Hb. Globular Media; P = Probabilidad
Celdas sombreadas indican diferencias significativas (P<0.05)

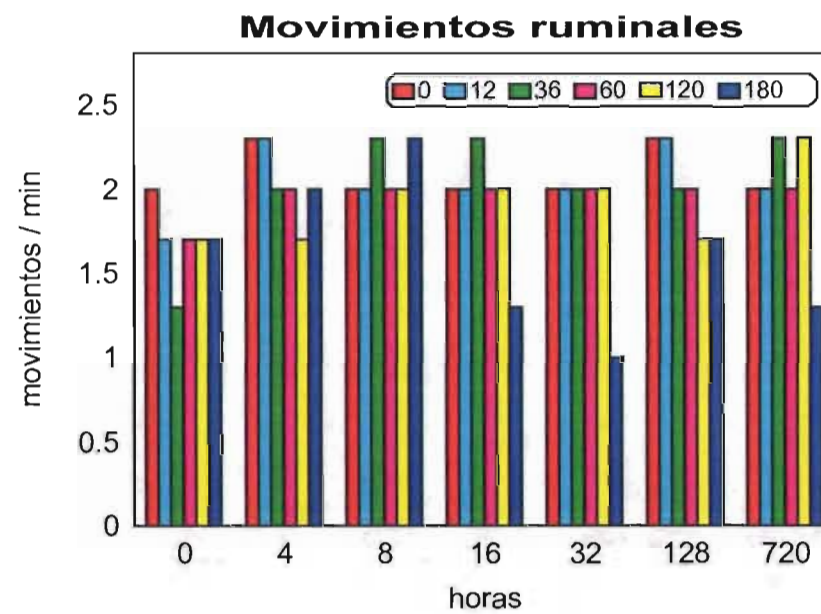
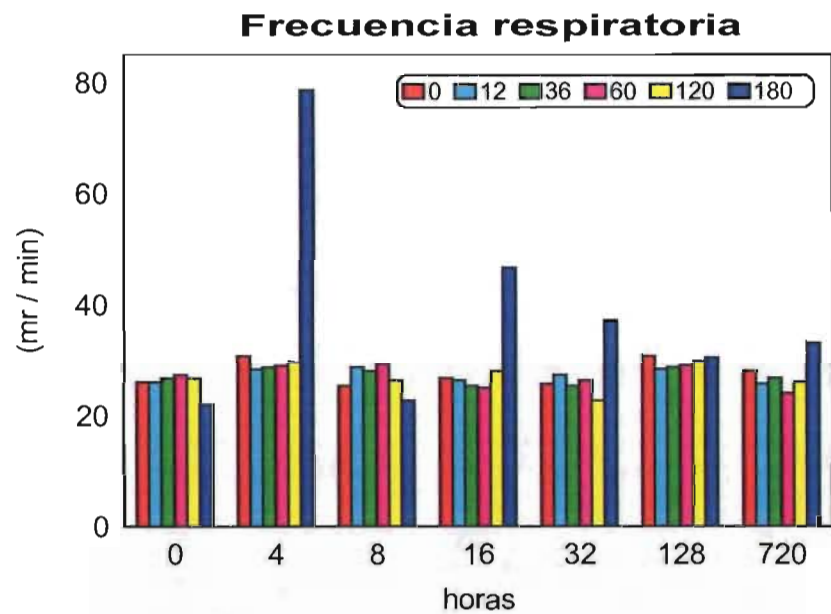
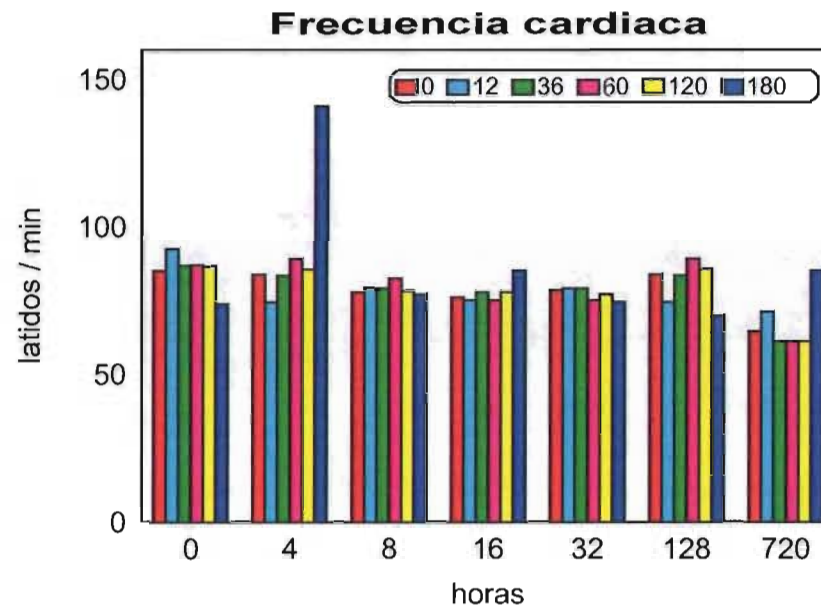
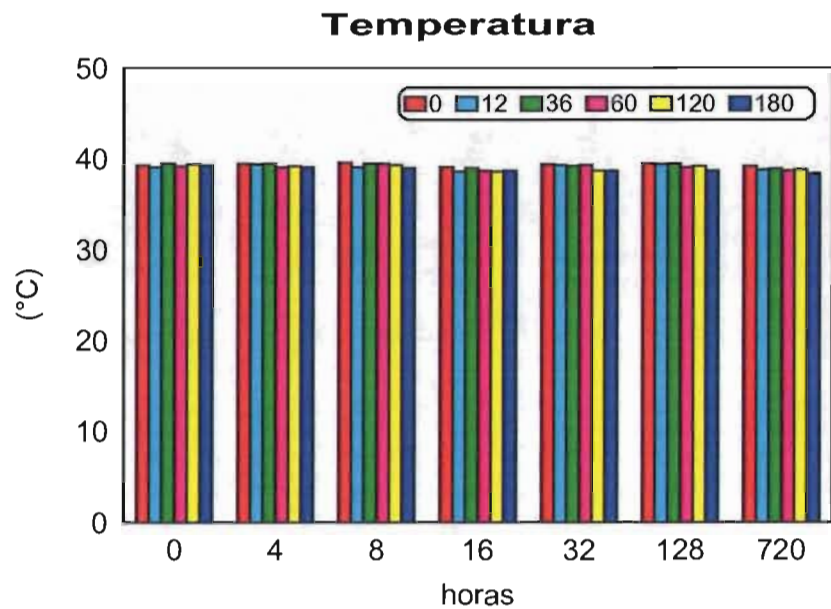


Figura 5.3. Comportamiento general de las constantes fisiológicas de los bovinos tratados a diferentes dosis del compuesto Alfa

Cuadro 5.3. Constantes fisiológicas de los bovinos tratados a diferentes dosis con el compuesto Alfa

Parámetros	Dosis (mg/kg/per os)											
	0*		12		36		60		120		180	
	**	P	**	P	**	P	**	P	**	P	**	P
Temperatura °C	39.4 ± 0.2	0.05	39.1 ± 0.5	0.19	39.3 ± 0.4	0.35	39.1 ± 0.4	0.02	39.0 ± 0.4	0.01	38.8 ± 0.4	0.19
Frecuencia cardiaca latidos/min.	78.7 ± 7.7	0	78.2 ± 9.3	0.09	78.9 ± 8.7	0	80.1 ± 10.2	0	79.0 ± 8.7	0	86.9 ± 26.0	0.01
Frecuencia respiratoria mr/min.	27.6 ± 2.7	0.09	27.2 ± 2.2	0.49	27.1 ± 2.7	0.57	27.1 ± 2.7	0.05	27.0 ± 3.1	0.04	38.8 ± 20.4	0
Movimientos ruminales / minuto	2.1 ± 0.5	0.91	2.1 ± 0.4	0.4	2.1 ± 0.5	0.13	2.0 ± 0.2	0.46	1.9 ± 0.4	0.46	1.6 ± 0.6	0.07

* = Testigo; ** = Promedio ± Desviación estandar; P = Probabilidad; mr= movimientos respiratorios; min = minuto
 Celdas sombreadas indican diferencias significativas (P<0.05)

XI. Experimento 6

ENSAYO CROMATOGRAFICO DE LA CINETICA DEL COMPUESTO ALFA EN LECHE DE BOVINOS

RESUMEN

Con la finalidad de determinar la permanencia de residuos del compuesto Alfa o 5-Cloro-6-(1-naftiloxi)-2-metiltio-1*H*-bencimidazol en leche, se utilizaron 14 vacas Holstein Friesian entre 3 a 6 años de edad las cuales estaban en plena producción. En la hora cero, Los animales se trataron con el compuesto Alfa a una dosis única de 12 mg/kg/vía oral. Posteriormente, se tomaron muestras de leche aproximadamente 250 ml por bovino a las 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 48, 64, 72, 128, 256, 512 y 1024 horas. Las muestras se mantuvieron a -70°C para su posterior análisis. Para este fin, se utilizó Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) de fase reversa con detector de arreglo de diodos a 304 nm, previamente las muestras se procesaron mediante un sistema de partición líquida - líquida y se determinaron las constantes de eliminación de los valores de cinética de primer orden del compuesto Alfa en la leche de los bovinos. Los resultados obtenidos indicaron que aún cuando la sensibilidad de la técnica es muy alta, los niveles del compuesto ALFA original y su metabolito sulfóxido no fueron detectables en los tiempos de muestreo analizados. Bajo las condiciones en que se realizó el presente estudio, se concluye que el tiempo de retención del compuesto Alfa es de 5.40 min, con un límite de detección de su metabolito de 12 ng/ml, indicando que el fármaco es eliminado en leche a concentraciones menores que las señaladas en este estudio dentro de las primeras 72 horas postratamiento.

INTRODUCCIÓN

El compuesto Alfa es un compuesto bencimidazolico que ha mostrado gran actividad contra estadios inmaduros tempranos, juveniles y adultos de *Fasciola hepatica* en bovinos Vera *et al* (2001 y 2004). Después de una administración oral este compuesto tiene una rápida biotransformación primeramente a su metabolito sulfóxido el cual se cree que posee la actividad fasciolicida y posteriormente a su metabolito sulfona Vértiz (2000).

Este comportamiento también puede deberse a que en los rumiantes los bencimidazoles se biotransforman en el rumen antes de metabolizarse en el hígado, sin embargo, la biotransformación en el rumen está limitada a la primera oxidación, por lo que el metabolito sulfóxido se presenta antes que el metabolito sulfona que se genera casi en su totalidad en el hígado (Lanusse *et al* 1992, 1993; Hennessy 1993).

Por otro lado, dentro de los análisis cuantitativos, la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) es el método más utilizado. De manera general es una técnica que se utiliza para separar componentes en una mezcla, siendo muy específica para el reconocimiento de uno o varios analitos de interés y permite a su vez una excelente separación de los componentes individuales haciendo un fácil reconocimiento de estos.

Asimismo, CLAR es un instrumento que hace que la técnica encuentre su aplicación en los análisis de biotecnología, biomédicos, clínicos y farmacéuticos entre otros, de ahí que se considera el método por elección en análisis farmacéuticos, empezando desde la síntesis o el aislado de una droga potencial hasta la etapa final de la información del mantenimiento, del control de calidad de la dosis formulada (Raghavan y Joseph, 2002). Importante de notar es que esta

técnica es la idónea para determinar concentraciones de un fármaco en leche de animales, particularmente de ovinos y bovinos.

Takeba *et al*, (1996) mencionan que en Japón, no existen restricciones gubernamentales en las concentraciones residuales de 30 antihelmínticos que se utilizan en el ganado. Sin embargo debido a que los antihelmínticos son retenidos en el tejido animal por periodos largos post-administración, se considera importante monitorear las concentraciones residuales en la leche. Con relación a fasciolidas, Takeba *et al*, (1996) mencionan que estos pueden ser transferidos a la leche en virtud de que esta puede darse a los infantes, razón por la que se deben determinar los residuos de fármaco en leche.

Por otro lado, De Ruyck *et al*, (2002) consideran la importancia de los periodos de retiro señalando que si estos no son respetados o si se trata de sustancias administradas no autorizadas, las concentraciones de residuos de un compuesto en leche pueden ser muy altos. De ahí el establecimiento de los Límites Máximos de Residuos (LMR) los cuales fueron creados para proteger al consumidor. De hecho, la Comunidad Europea (EEC, 1990) ha disminuido estos límites de residuos máximos, razón que fortalece la relevancia de validar un procedimiento analítico para detectar y cuantificar residuos del compuesto Alfa.

ANTECEDENTES

Toutain *et al*, (1988) realizaron estudios farmacocinéticos administrando ivermectina por vía subcutánea a la dosis recomendada en vacas Holstein Freisian. Sus análisis mostraron que en el primer tiempo de muestreo (12 horas posttratamiento), el fármaco alcanzó su máxima concentración habiendo sido detectado en leche por 17.5 ± 6.34 días después del tratamiento y las cantidades

recuperadas durante este periodo fueron de $5.46 = 1.19\%$ de la dosis administrada. Los autores señalan que este resultado es muy alto.

Por otro lado Alvinerie et al, (1987), determinaron mediante CLAR la fracción B1a de ivermectinas en leche, demostrando un límite de detección de 2 ng/ml.

Adicionalmente, La Federación Internacional de Ganado Lechero (International Dairy Federation) (1990), señala que en Alemania los límites de residuos de fármacos en leche tales como los fasciolicidas es de 10 ng/ml.

Fletouris *et al*, (1996) realizaron mediante CLAR, un escrutinio cuantitativo de residuos en leche de varios compuestos benzimidazolicos y sus recuperaciones variaron de manera general en un rango entre 79 y 100%, teniendo una linealidad excelente. Sin embargo, en esta evaluación no se incluyó al triclabendazol, fasciolicida ampliamente conocido a nivel mundial.

El compuesto ALFA ha demostrado también su actividad fasciolicida en bovinos infectados en forma natural y experimental (Vera *et al*, 2001, 2002, 2003, 2004; Ibarra *et al*, 2004). Esta eficacia ha motivado a adentrarse en estudios concernientes a su farmacocinética (Del Rivero, 1998 y Vértiz 2000) y toxicidad (Ayala, 2003), vinculando con ello la necesidad de dilucidar los porcentajes de eliminación del compuesto en leche, para determinar el período de retiro postratamiento.

Es importante mencionar que la mayoría de estudios realizados con CLAR hacen referencia a determinaciones de antihelmínticos en plasma, orina, bilis y músculo (Alvinerie y Galtier, 1986; Lehr y Damm, 1986; Mohammed-Ali y Bogan, 1987; Hennessy et al, 1987; Sanyal, 1995; Negro et al, 1992), por lo que la información publicada con relación a leche es muy limitada.

En lo referente a la determinación de antihelmínticos en leche mediante Cromatografía de Líquidos (LC), Takeba *et al*, (1996) publicaron un método específico para monitorear niveles residuales de 5 fasciolidas indicando que la prueba es altamente sensible y capaz de determinar simultáneamente los fármacos mencionados.

En virtud de que no existe metodología disponible para la determinación del compuesto Alfa y sus metabolitos en leche, se requiere de la estandarización de un método simple, rápido y sensible diseñado para este fin.

OBJETIVO

El objetivo del presente estudio fue el de determinar mediante un ensayo cromatográfico la permanencia de residuos del compuesto Alfa postratamiento en leche de vacas en pleno estado de producción.

MATERIAL Y METODOS

Localización del estudio.- El estudio se llevó a cabo en el Centro de Enseñanza, Producción e Investigación Salud Animal (CEPIPSA), de la UNAM, y los análisis en el laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Animales.- Se utilizaron 14 vacas Holstein Friesian entre 3 a 6 años de edad las cuales estaban en plena producción.

Antihelmíntico.- Se utilizó el compuesto Alfa para administración oral, formulado en suspensión al 10%.

Desarrollo del estudio.- En la hora cero, se dosificaron las vacas con el compuesto ALFA a una dosis única de 12 mg/kg/vía oral. Posteriormente se tomaron muestras de leche (250 ml) por individuo a tiempos de: 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 48, 64, 128, 256, 512, y 1024 horas. Dichas muestras se transportaron en refrigeración a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, las cuales fueron puestas en congelación (-70°C) para su posterior análisis.

El análisis se realizó en un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (CLAR). El cual tenía las siguientes características: Sistema cromatográfico Perkin Elmer serie 200 con bomba binaria, automuestreador y detector de arreglo de diodos. La fase móvil consistió de metanol, agua y acetonitrilo (40:40:20). Una columna de separación XFR spheri 5 RP 18 Perkin-Elmer de 100 mm con tamaño de partícula de 5 μ m. La lectura se realizó a 304 nm.

Para la extracción del compuesto se emplearon 5 ml de leche de acuerdo al método de Fletouris *et al* (1996) modificado. Se alcalinizó con 500 μ l de hidróxido de sodio 0.4 Molar a pH 10 mezcla y adicionó 30 ml de acetato de etilo, se agitó con un vortex a alta velocidad por 30 seg, se centrifugó a 4000 g durante 2 min. Se tomó una alícuota de 20 ml del sobrenadante claro y se pasó a otro tubo, adicionando 4 ml de agua grado cromatografía de líquidos, se agitó por 10 seg y centrifugó a 1000 g /30 seg. Se transfirieron 10 ml de la capa superior orgánica a otro tubo y se evaporó a sequedad a 50 centígrados con un flujo de nitrógeno. Se reconstituyo en 0.5 ml de fase móvil, se mezcló en vortex y procedió al análisis por CLAR. Para el cálculo de la concentración del compuesto se empleo un estandar externo y método de adición, para establecer el porcentaje de recuperación del compuesto durante la extracción.

Mediante el método de adición se determinó el porcentaje de recuperación de la técnica analítica para establecer el límite de detección real, ajustando los resultados a estos valores de recuperación.

Análisis del comportamiento cinético.- La información obtenida fue sometida a un análisis estadístico por medio del PK ANALYST, para determinar las constantes de la cinética de eliminación.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos pueden observarse en las Figuras 6.1 a la 6.8

En la Figura 6.1 se observa la presencia del metabolito sulfóxido estandar para determinar el tiempo de detección el cual fue de 5.40 min.

En la Figura 6.2 se identifica la presencia del metabolito sulfona con un tiempo de retención de 1.02 min.

Para evaluar la detección de los metabolitos, se utilizaron a los cromatogramas 1 y 2 como estandares de referencia, indicando que aun cuando la sensibilidad de la técnica es muy alta los niveles del compuesto Alfa original y sus metabolitos sulfóxido y sulfona no fueron detectables en los tiempos de muestreo analizados.

A partir de los muestreos de leche realizados a la 1, 8, 16, 32, 64 y 72 horas se aprecia que ninguno de los metabolitos pudo ser detectado tal y como se observa en las gráficas de las Figuras 6.3 al 6.8.

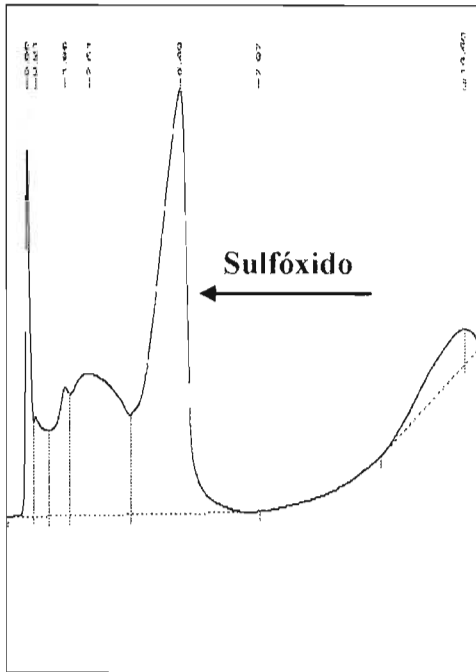


Fig 6.1 metabolito sulfóxido (estandar)

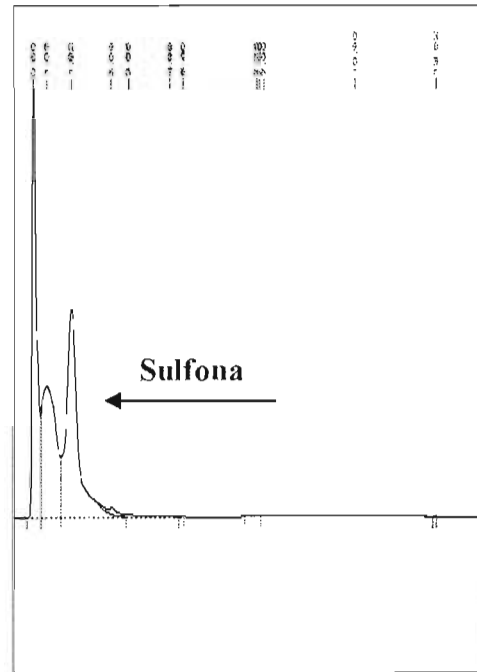


Fig 6.2 metabolito sulfona (estandar)

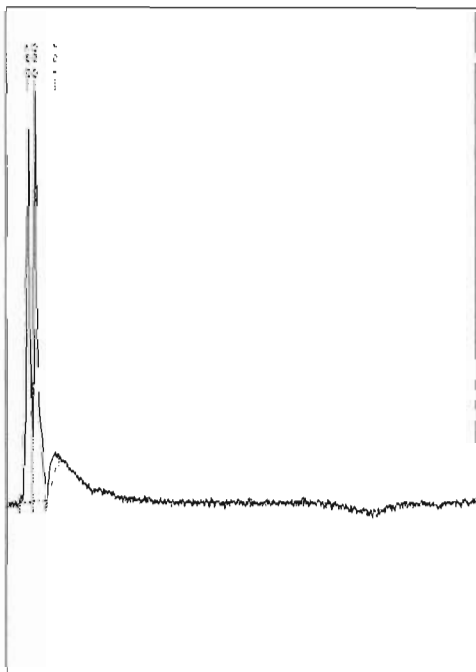


Fig 6.3 leche 1 hora

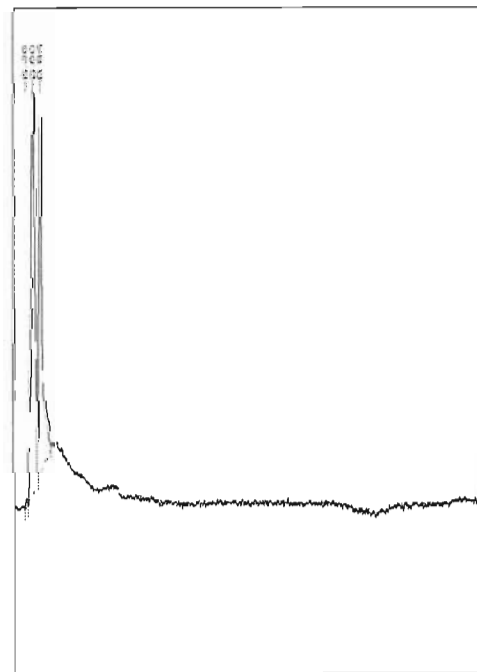


Fig 6.4 leche 8 horas

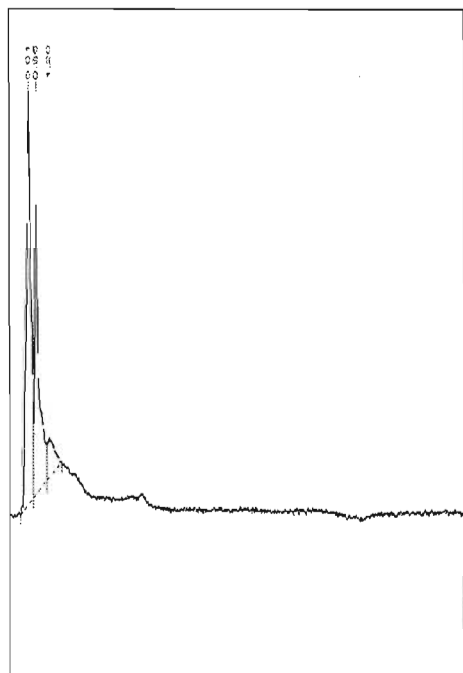


Fig 6.5 leche 16 horas

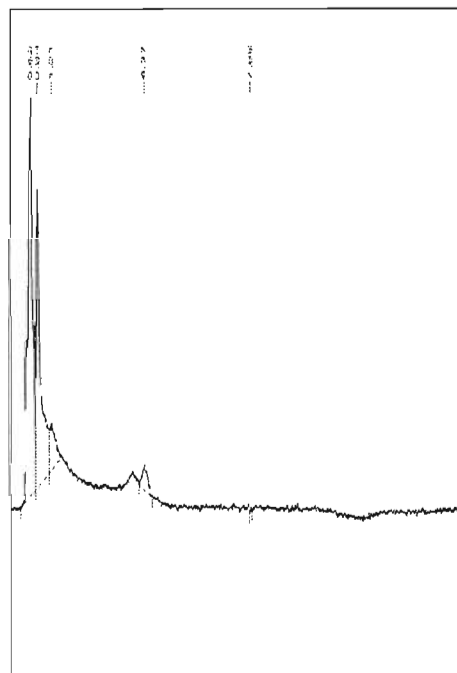


Fig 6.6 leche 32 horas

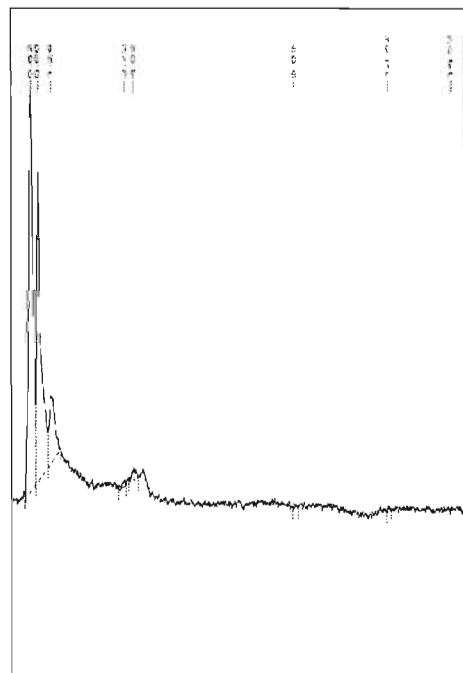


Fig 6.7 leche 64 horas

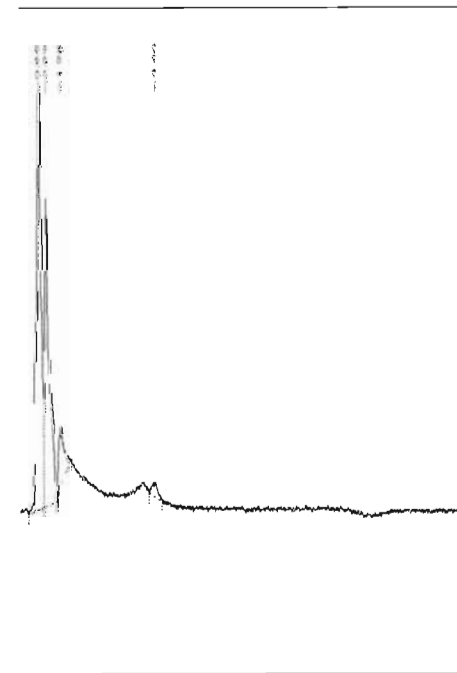


Fig 6.8 leche 72 horas

DISCUSION

Como se ha señalado anteriormente el compuesto Alfa es un bioisómero del triclabendazol, razón que lo ubica como un compuesto con estructura similar a la de este último compuesto.

De Ruyck et al, (2002) señalan que el triclabendazol es un antihelmíntico no autorizado en Europa para ser administrado en ganado lechero, razón por la cual se requiere de un método muy sensible capaz de detectar los Límites Máximos de Residuos (LMR) en leche. Los mismos autores, establecieron para bencimidazoles incluyendo al triclabendazol un Límite Máximo Permitido (LMP) de 1.0 µg/l. Considerando que el triclabendazol es eliminado en leche en un porcentaje menor al 1% (Fletouris and Botsoglou, 2001), se cree que el compuesto Alfa al ser un fármaco parecido en estructura, se elimina en un porcentaje similar.

En el presente estudio, los niveles máximos de detección del compuesto Alfa fueron de 12 ng/l, indicando que este fasciolicida experimental es eliminado en leche a niveles menores de los detectados proporcionando una amplia seguridad para su consumo ya que como se señaló anteriormente el LMP para triclabendazol es de 1.0 µg/l. Sin embargo se sugiere correr un nuevo experimento administrando una dosis mayor de compuesto Alfa a las vacas para poder detectar niveles mayores de concentración y establecer límites máximos mediante cromatogramas determinando curvas de eliminación a través del tiempo.

Fletouris et al, (1997) reportan la determinación de residuos de albendazol marcados en leche utilizando Cromatografía de líquidos. Sus resultados indicaron porcentajes de recuperación de 85.3%, 96.4% y de 83.4% para el sulfóxido, sulfona y metabolitos 2-amino, respectivamente. Su método permitió detectar límites de ng ml⁻¹. Los autores describen a este método como exitoso para

detectar residuos en leche de vacas tratadas con albendazol y también para estudios de estabilidad de los residuos del fármaco en almacenamiento.

Baggot y McKellar (1994) mencionan que la disponibilidad sistémica de la mayoría de fármacos que se administran por vía oral, es menor en especies de herbívoros (caballos y rumiantes) que en humanos, perros y gatos. Esto puede atribuirse parcialmente a una capacidad metabólica mayor del hígado y efecto de primer paso en los herbívoros.

Otro aspecto importante de notar es la baja solubilidad que presentan los benzimidazoles, situación que no escapa a las características del compuesto Alfa. Este factor limita su disolución y retarda la absorción a nivel ruminal mientras transita en un corto período en el tracto gastrointestinal y por ende contribuye a su menor biodisponibilidad. Adicionalmente, esta falta de solubilidad también afecta la actividad de la flora ruminal.

Más recientemente, De Ruyck et al, (2002) claramente señalan que la identificación y confirmación de propiedades de antihelmínticos analizados en fila por Espectrofotometría de Masas, es una herramienta poderosa con gran capacidad de separación y gran especificidad siendo superior a la tradicional cromatografía de líquidos con arreglo de diodos.

Por lo anteriormente señalado, es plenamente deseable el contar con estándares de nivel residual para estos fármacos que se encuentran en los alimentos.

CONCLUSION

Los resultados de este estudio indican que debido a la falta de detección de los Límites Máximos Permitidos, el período de retiro recomendado para el compuesto

Alfa no fue establecido. Sin embargo, se demostró que el compuesto Alfa no se elimina en cantidades mayores a los 12 ng/ml en un período de 1 hora. El tiempo de retención mediante CLAR es de 5.40 minutos y los límites de detección de su metabolito es de 12 ng/ml. Estos resultados indican que no existe riesgo de salud al comparar con los niveles de residuos en leche determinados para el triclabendazol.

REFERENCIAS

- Alvinerie M, Galtier P. Assay of triclabendazole and its main metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography . J Chromatog. 1986; 374: 409-414.
- Alvinerie M, Sutra JF, Galtier P, Toutain PL. Dation of ivermectin in milk by high performance liquid chromatography. Annales de Recherche Veterinaire. 1987; 18: 269-274.
- Ayala AS. Evaluación toxicológica del compuesto fasciolicida alfa en vacas gestantes. (tesis de maestría). México, D.F: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.2003.
- Baggot JD, McKellar QA. The absorption, distribution and elimination of anthelmintic drugs: the role of pharmacokinetics. J. Vet. Pharmacol. Therap. 1994; 17: 409-419.
- De Ruyck H, Daeseleire E, De Ridder H, Van Renterghem R. Development and validation of a liquid chromatographic-electrospray tandem mass apectrometric multiresidue method for anthelmintics in milk. J. Chromatogr A. 2002; 976: 181-194.
- Del Rivero LM. Farmacocinética del α -BIOF10 en borregos. (tesis de maestría). México, D.F: Facultad de Química, Estudios de Posgrado. Universidad Nacional Autónoma de México. 1998.
- EEC, Council Regulation No. 2377/90, Off. J. Eur. Commun. L 244/1. 1990.

- Fletouris DJ, Botsoglou NA, Psomas IE, Mantis AI. Determination of the marker residue of albendazole in milk using ion-pair liquid chromatography and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*. 1997; 345: 111-119.
- Fletouris DJ, Nickos B, Psomas IE, Mantis AI. Rapid quantitative screening assay of trace benzimidazole residues in milk by liquid chromatography. *J. AOAC Internat*. 1996; 79 (6): 1281- 1287.
- Hennesy DR, Lasey E, Steel JW, Prichard RK. The Kinetics of triclabendazole disposition in sheep. *J. Vet Pharmacol Therap*. 1987; 10: 64-72.
- Ibarra VF, Vera MY, Quiroz RH, Cantó J, Castillo BR, Hernández CA, Ochoa GP. Determination of the effective dose of an experimental fasciolicide in naturally and experimentally infected cattle. *Vet Parasitol* 2004; 120: 65-74.
- International Dairy Federation 1990 A-Doc 123: 17-20.
- Lanusse CE, Nare B, Gascón LH, Prichard RK. Metabolism of albendazole and albendazole sulphoxide by ruminal and intestinal fluids of sheep and cattle. *Xenobiotica*. 1992; 23(4): 285-295.
- Lanusse CE, Gascón LH, Prichard RK. Gastrointestinal distribution of albendazole metabolites following netobimin administration to cattle : relationship with plasma disposition kinetics. *J. Vet. Pharmacol. Therap*. 1993; 16 (1): 38-47.
- Hennesy D. Pharmacokinetic disposition of benzimidazole drugs in the ruminant gastrointestinal tract. *Parasitol Today*. 1993; (9): 329-333.
- Lehr KH, Damm P. Simultaneous determination of fenbendazole and its two metabolites and two triclabendazole metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatog*. 1986; 382: 355-360.
- Mohammed-Ali NAK, Bogan JA. The pharmacodynamics of the flukicidal salicylanides, rafoxanide, closantel and oxcyclosanide. *J. Vet Pharmacol Therap* 1987; 127: 127-133.
- Negro A, Alvarez-Bujidos ML, Ortiz AI, Cubria C, Méndez R, Ordóñez D. Reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatographic determination of triclabendazole metabolites in serum and urine. *J. Chromatog* 1992; 576: 135-141.

- Raghavan R, Joseph JC. Chromatographic methods of analysis-High-Performance Liquid Chromatography. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. 2002; 414-425.
- Sanyal PK. Kinetic disposition of triclabendazole in buffalo compared to cattle. J. Vet Pharmacol Therap. 1995; 18: 370-374.
- Takeba K, Fujinuma K, Sakamoto M, Tomoyuki M, Oka H, Itoh Y, Nakazawa H. Simultaneous determination of triclabendazole and its sulphoxide and sulphone metabolites in bovine milk by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr 2000; 882: 99-107.
- Toutain PL, Campan M, Galtier P, Alvinerie M. Kinetic and insecticidal properties of ivermectin residues in the milk of dairy cows. J Vet Pharmacol Therap. 1988; 11: 288-291.
- Vera MY, Ibarra VF, Quiroz RH, Ríos UA, Castillo BR, Hernández CA. Eficacia del 6-cloro-2-metil-5-(1-naftiloxi) bencimidazol contra *Fasciola hepatica* de cuatro y diez semanas de edad en bovinos de México. Vet. Mex. 2001; 32(1): 77-80.
- Vera MY, Ibarra VF, Cantó AJG, Hernández CA, Castillo BR. Determinación de máxima dosis tolerada e índice de seguridad del compuesto fasciolicida alfa en bovinos. XXXVIII. Reunion Nacional de Investigación Pecuaria. Puebla 2002. 28 de octubre al 1 de noviembre del 2002.
- Vera MY, Ibarra VF, Quiroz RH, Hernández CA, Castillo BR. Field trial on the efficacy of an experimental fasciolicide compared with some commercial compounds in naturally infected cattle. Parasitol Res 2003; 91: 1- 4.
- Vera MY, Ibarra VF, Liéban HE, Quiroz RH, Castillo BR, Hernández CA, Ochoa GP. Efficacy of an experimental fasciolicide against immature and mature *Fasciola hepatica* in artificially infected. Parasitol Res 2004; 92: 211-214.
- Vertiz SG. Evaluación farmacocinética de ∞ BIOF10 en ganado vacuno. (tesis de maestría en Farmacia (Biofarmacia)). México, D.F: Facultad de Química. Estudios de Posgrado. Universidad Nacional Autónoma de México. 2000.

XII. CONCLUSIONES GENERALES

Con base en los estudios realizados tanto en condiciones experimentales controladas, como en condiciones de campo en bovinos infectados con *Fasciola hepatica* en forma natural, se determinó que la Dosis Efectiva para el compuesto Alfa es de 12 mg/kg/p.o.

Las diversas evaluaciones biológicas mostraron una actividad fasciolicida altamente promisorio, tanto contra los estadios inmaduros tempranos como para los estadios juveniles y adultos.

El compuesto Alfa muestra un alto grado de Tolerancia por los bovinos en virtud de que aún cuando se administraron dosis superiores a la dosis clínica recomendada, no se detectaron alteraciones en sus parámetros fisiológicos, bioquímicos ni hematológicos confiriendo con ello un amplio Margen de Seguridad el cual es muy superior al de la mayoría de fasciolicidas comerciales disponibles en el mercado a nivel mundial.

Los ensayos sobre la permanencia de residuos del compuesto Alfa en leche valorada mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), indican que no existe ningún riesgo de salud pública.

La información obtenida hasta el momento, ubica al compuesto experimental Alfa como un fasciolicida de producción mexicana, eficaz y seguro, indicado para controlar infecciones por *Fasciola hepatica* en bovinos.

XIII. ARTICULOS PUBLICADOS Y EN PROCESO

- 1.- Determination of the effective dose of an experimental fasciolicide in naturally and experimentally infected cattle. Froylán Ibarra, Yolanda Vera, Héctor Quiroz, Jorge Cantó, Rafael Castillo, Alicia Hernández, Pedro Ochoa. *Veterinary Parasitology* 2004; 120: 65-74.

- 2.- Eficacia del 6-cloro-2-metiltio-5-(1-naftiloxi) bencimidazol contra *Fasciola hepatica* de cuatro y diez semanas de edad en bovinos de México. Vera MY, Ibarra VF, Quiroz RH, Ríos UA, Castillo BR, Hernández CA. *Veterinaria México*. 2001; 32(1): 77-80.

- 3.- Efficacy of an experimental fasciolicide against immature and mature *Fasciola hepatica* in artificially infected calves. Y. Vera Montenegro, F. Ibarra Velarde, E. Liébano Hernández, H. Quiroz Romero, R. Castillo Bocanegra, A. Hernández Campos, P. Ochoa Galván. *Parasitology Research* 2004; 92: 211-214.

- 4.- Field trial on the efficacy of an experimental fasciolicide compared with some commercial compounds in naturally infected cattle. Y. Vera Montenegro, F. Ibarra Velarde, H. Quiroz Romero, A. Hernández Campos, R. Castillo. *Parasitology Research* 2003; 91: 1- 4.

5. Determination of the maximum tolerated dose and the safety index of an experimental fasciolicide in cattle. Yolanda VERA, Froylán IBARRA, Jorge CANTÓ, Olivia SORIA, Alicia HERNÁNDEZ, Rafael CASTILLO. Sometido a *Veterinary Research*.

6. Chromatographic assay for kinetics of a new experimental fasciolicide in milk from cattle. Y Vera-Montenegro, J Bautista-Ordoñez; F Ibarra-Velarde; R Rosiles-Martínez; A Hernández-Campos; R Castillo-Bocanegra. *Por someter al: Journal of Chromatography A.*

APENDICE 1

Métodos utilizados para los análisis de plasma y sangre

P r u e b a	Abreviatura	Método/Referencia
Análisis de sangre		
Conteo de células rojas	RBC	Coulter Counter
Conteo de células blancas	WBC	Coulter Counter
Volúmen paquete celular	PCV	Microhematocrito
Hemoglobina	Hb	Formación cyanmetahemoglobina
Análisis de plasma		
Proteína total	---	Weichselbaum (1946)
Albumina	---	Northam and Widdowson (1967)
Glucosa	---	Trinder (1969)
Nitrógeno ureico	---	Marsh et al (1965)
Bilirrubina	---	Rand and Di Pasqua (1962)
Colesterol	---	Roschlau et al (1974)
Triglicéridos	---	Bucolo and David (1973)
Glutamato deshidrogenasa	GLDH	Ellis and Goldberg (1972)
Sorbitol deshidrogenasa	SDH	Gerlach and Schürmeyer (1960)
Gama glutamil transpeptidasa	GGT	Szasz (1969)
Fosfatasa alcalina	AP	Hausamen <i>et al</i> (1967)
Deshidrogenasa láctica	DHL	Wroblewski and La Due (1955)



ELSEVIER

Determination of the effective dose of an experimental fasciolicide in naturally and experimentally infected cattle

Froylán Ibarra^{a,*}, Yolanda Vera^a, Héctor Quiroz^a,
Jorge Cantó^b, Rafael Castillo^c, Alicia Hernández^c,
Pedro Ochoa^d

^a Departamento de Parasitología, Fac. de Med. Vet. y Zoot., UNAM. Cd. Universitaria, 04510 Mexico, DF, Mexico

^b Departamento de Parasitología, Universidad de Querétaro, Qro., Mexico

^c Facultad de Química, UNAM. Cd. Universitaria, 04510 Mexico, DF, Mexico

^d Departamento de Genética y Estadística, Fac. de Med. Vet. y Zoot., UNAM. Cd. Universitaria, 04510 Mexico, DF, Mexico

Received 28 May 2003; received in revised form 15 December 2003; accepted 15 December 2003

Abstract

The aim of the present study was to determine the effective dose of an experimental fasciolicide called compound alpha or 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)1*H*-benzimidazole in experimentally and naturally infected cattle. In the first experiment, 24 fluke-free heifers were each infected with 800 metacercariae of *Fasciola hepatica* and re-infected on day 45 with other 600 cysts per animal. On day 75, when the animals had 4- and 10-week-old flukes respectively, they were divided into four groups (G) of six animals each according to fluke egg counts. Groups 1–3 received compound alpha at 10, 12 and 14 mg/kg/p.o., respectively. G4 remained as an untreated control. Twenty days after treatment, the animals were sacrificed for the recovery of flukes. Efficacy was assessed as a percentage of egg or fluke reduction relative to the untreated control. In the second experiment (naturally infected cattle), 24-year-old steers positive to *F. hepatica* eggs were blocked into four groups of five animals each. Groups 1–3 received compound alpha at 10, 12 and 14 mg/kg/p.o., respectively. Group 4 served as a non-treated control. All procedures to determine efficacy were carried out as mentioned in the first experiment. The results in the first study showed a percentage on egg reduction of 97.3, 100 and 100 and overall fluke reduction of 94.3, 100 and 100 for Groups 1–3, respectively. In the second study, the percentage of egg reduction was of 87.5, 99.1 and 100 and overall efficacy regarding fluke reduction was of 84.2, 99.6, and 100 for

* Corresponding author. Tel.: +52-56-22-58-99; fax: +52-56-22-59-71.
E-mail address: ibarraf@servidor.unam.mx (F. Ibarra).

Eficacia del 6-cloro-2-metiltio-5-(1-naftiloxi) bencimidazol contra *Fasciola hepatica* de cuatro y diez semanas de edad en bovinos de México

Yolanda Vera Montenegro*
Froylán Ibarra Velarde*
Héctor Quiroz Romero*
Ángel Ríos Utrera**
Rafael Castillo Bocanegra***
Alicia Hernández Campos***

Abstract

The aim of this study was to evaluate the fascioliscide efficacy of 6-chloro-2-metiltio-5-(1-naftiloxi) bencimidazol called compound "alfa" against 4 and 10 week-old flukes in cattle. Fifteen *Fasciola hepatica* fluke-free steers were divided into 3 groups of 5 animals each. Each animal was orally infected with 300 metacercariae given 150 on day 0 and 150 on day 45. All animals were sampled for faeces to determine the presence of *Fasciola*-eggs by means of coprological analysis. On day 75, Groups 1 and 2 were treated with compound alfa and triclabendazol at a dose of 12 mg/kg per os, respectively. Group 3 remained as the non-treated control. Forty-five days after treatment, all animals were sacrificed; the liver was isolated to count the flukes. Efficacy was assessed on the number of flukes present in the treated groups in relation to the control one. Results indicated an efficacy of 99.4% for compound alfa, and of 100% for triclabendazol, respectively. It is concluded that compound alfa exerted a high efficacy against 4 and 10 week-old flukes.

Key words: EFFICACY, EXPERIMENTAL FASCIOLISCIDE, CATTLE

Resumen

El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia fasciolicida del 6-cloro-2-metiltio-5-(1-naftiloxi) bencimidazol denominado compuesto "alfa" contra fasciolas de cuatro y 10 semanas de edad en bovinos. Se utilizaron 15 novillos libres de infección por *F. Hepatica* que se infectaron por vía oral con 300 metacercarias, administradas 150 en el día 0 y 150 en el día 45, respectivamente. A todos los bovinos se les tomaron muestras de heces con el propósito de corroborar la presencia del parásito mediante análisis coprológicos. El día 75, los grupos 1 y 2 fueron tratados con los compuestos alfa y triclabendazol a dosis única de 12 mg/kg, vía oral. El grupo 3 quedó como testigo sin tratamiento. A los 45 días postratamiento todos los bovinos fueron sacrificados para separar el hígado y cuantificar los vermes presentes. La eficacia se midió con base en el número de fasciolas presentes en los grupos tratados respecto del testigo. Los resultados indicaron una eficacia de 99.4% para el compuesto alfa y de 100% para el triclabendazol. Se concluye que el compuesto alfa mostró alta eficacia contra fasciolas de cuatro y diez semanas de edad.

Palabras clave: EFICACIA, FASCIOLICIDA EXPERIMENTAL, BOVINOS.

Recibido el 29 de junio de 2000 y aceptado el 31 de octubre de 2000.

* Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

** Campo Experimental Pecuario "Las Margaritas" del estado de Puebla, México, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

*** Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

Y. Vera Montenegro · F. Ibarra Velarde
E. Liébano Hernández · H. Quiroz Romero
R. Castillo Bocanegra · A. Hernández Campos
P. Ochoa Galván

Efficacy of an experimental fasciolicide against immature and mature *Fasciola hepatica* in artificially infected calves

Received: 20 July 2003 / Accepted: 8 September 2003 / Published online: 3 December 2003
© Springer-Verlag is a part of Springer Science + Business Media 2003

Abstract The efficacy of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthylthio)-*IH*-benzimidazole, called “alpha”, was tested against *Fasciola hepatica*. Fluke-free calves ($n=32$) were divided into 8 groups and infected with 150 metacercariae per animal. All animals subsequently received a second infection with another 150 metacercariae, given at different time intervals aimed to produce flukes of differing ages within the experimental animals. When the flukes reached the required age in the animals, four groups were treated with a single oral dose of 12 mg/kg of compound alpha and the remaining ones served as non-treated controls. Two weeks after treatment the animals of all groups were sacrificed and the livers were removed to determine the numbers of parasites present in the treated and untreated controls. In the treated groups the fluke reduction for the 3 day/2 week group was 100%, for the 3 week/4 week group it was 96.4%, for the 6 week/8 week group it was 99.2% and for the 10 week/12 week group it was 100%.

Introduction

In view of the economic importance of bovine fasciolosis in Mexico, a new fasciolicide, 5-chloro-2-methylthio-6-

Taken in part from the PhD thesis of Yolanda Vera Montenegro

Y. Vera Montenegro · F. Ibarra Velarde (✉) · H. Quiroz Romero
Depto. de Parasitología, FMVZ-UNAM, Cd. Universitaria 04510,
Mexico City, Mexico
E-mail: ibarraf@servidor.unam.mx
Fax: + 52-55-56225971

E. Liébano Hernández
CENID-Pavet, INIFAP, Km 12.5, Cuernavaca-Cuautla,
Edo. de Morelos, Mexico

R. Castillo Bocanegra · A. Hernández Campos
Depto. de Farmacia, Facultad de Química, UNAM,
Cd. Universitaria 04510, Mexico City, Mexico

P. Ochoa Galván
Depto. de Estadística, FMVZ-UNAM, Cd. Universitaria 04510,
Mexico City, Mexico

(1-naphthylthio)-*IH*-benzimidazole (known as “alpha”) has been developed (Hernández et al. 2002) and has shown high efficacy when tested on sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* (Ibarra et al. 1996, 1997a, b, 2000; Vera et al. 2001; Rivera et al. 2002). The pharmacokinetics of the drug have also been investigated in sheep (Del Rivero 1998) and cattle (Vertiz 2000). The aim of the present study was to evaluate the efficacy of alpha as a fasciolicide against immature and mature *F. hepatica* in experimentally infected calves.

Materials and methods

Animals

Thirty-two crossbred calves, 1–2 years old, were used. They were born and located at the National Center for Parasitology in Jiutepec state of Morelos (central part of Mexico), which is recognized as a free-fluke area. The calves were fed on green alfalfa and some commercial pelleted food for cattle, and water was supplied ad libitum.

Experimental procedure

Prior to the experiment, fecal and serum samples from the calves were analyzed by the sedimentation test (MAFF 1988) and indirectly by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Ibarra et al. 1998) to ensure that they really were free of flukes. On day zero each calf was infected with 150 metacercariae of *F. hepatica* and, afterwards, a second stepped infection of another 150 metacercariae was given per calf, adjusting exact timings to produce flukes of different ages. When the flukes reached the required age for treatment in the animals, four groups of 8 animals each were formed, from which 4 animals were treated and the other 4 served as untreated controls. Group G1 had flukes 3 days and 2 weeks old, G2 had flukes 3 and 4 weeks old, G3 had flukes 6 and 8 weeks old, and G4 had flukes 10 and 12 weeks old.

Treatment

Compound alpha, formulated as a 10% suspension, was administered by mouth at a dose rate of 12 mg/kg when the flukes had reached the ages for the previously defined groups.

Y. Vera Montenegro · F. Ibarra Velarde
H. Quiroz Romero · A. Hernández Campos · R. Castillo

Field trial on the efficacy of an experimental fasciolicide compared with some commercial compounds in naturally infected cattle

Received: 2 April 2003 / Accepted: 10 April 2003 / Published online: 3 July 2003
© Springer-Verlag 2003

Abstract The efficacy of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1*H*-benzimidazole was evaluated with three commercial fasciolicides in terms of the percentage of egg reduction in cattle. Fifty Swiss cows were selected for inclusion in the trial based on finding eggs of *Fasciola hepatica* in their feces. On day 0, they were blocked in five groups (G) of ten animals each according to fecal egg counts. G1 received compound alpha at 12 mg/kg p.o.; G2 triclabendazole at 12 mg/kg p.o.; G3.closantel at 3.5 mg/kg s.c.; G4 clorsulon at 2.0 mg/kg s.c. G5 animals served as untreated controls. Fecal analysis was performed on days 0, 7, 14, 21, 28, 60 and 90. Efficacy was measured on days 14 and 21. In addition, the extension and intensity effects were determined on day 60. The percentage efficacy for groups 1–4 was 98.1, 98.7, 98.2 and 97.9 on day 14 and 98.5, 97.9, 97.7 and 97.9 on day 21, respectively. No statistical differences were observed between treated groups.

Introduction

The 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1*H*-benzimidazole, called compound alpha (Hernández et al. 2002), has been previously tested as a fasciolicide in sheep (Ibarra et al. 1997a, 1997b, 2000; Rivera et al. 2002), showing promising results. However, the population of sheep in Mexico is far smaller than that of cattle. All fasciolicides available on the Mexican market

are imported, or they are prepared with foreign materials, a situation which makes the products expensive and economically inaccessible to the common cattle producer. Therefore, local efforts have been made to develop a safe, effective and non-expensive fasciolicide. The aim of the present work was to determine the efficacy of compound alpha along with three other commercial fasciolicides, measured by the percentage of egg-reduction in naturally infected cattle.

Materials and methods

Location of the study

This work was carried out at the farm called “Copalar” located in an endemic zone of fasciolosis with a warm humid climate at Monte Gordo, State of Veracruz, Mexico.

Experimental animals

Fifty 1- to 6-year-old Swiss cows naturally infected with *Fasciola hepatica* were used.

Anthelmintics

Compounds alpha (experimental compound), triclabendazol (TCB) (Ciba-Geigy), clorsulon (Merck) and closantel (Cyanamid), were used according to the manufacturer’s instructions.

Study procedure

Prior to the start the experiment, animals were sampled for feces on day 8 to select those with the highest number of eggs using the sedimentation test. (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food 1988).

On day 0, animals were blocked into five groups of ten animals each, according to fecal egg counts. Treatments were given once. They were sequentially allocated to animals in each block as follows: group (G)1, treated with compound alpha at 12 mg/kg p.o.; G2 TCB at 12 mg/kg p.o.; G3 closantel at 3.5 mg/kg s.c.; G4 clorsulon at 2.0 mg/kg s.c., while G5 served as non-treated controls. Individual fecal analyses were performed on days 0, 7, 14, 21, 28, 60 and 90.

Taken in part from the PhD thesis of Yolanda Vera Montenegro

Y. Vera Montenegro · F. Ibarra Velarde (✉) · H. Quiroz Romero
Departamento de Parasitología,
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,
UNAM, CP. 04510 Mexico City, Mexico
E-mail: ibarraf@servidor.unam.mx
Fax: +52-55-56225971

A. Hernández Campos · R. Castillo
Facultad de Química, UNAM,
CP. 04510 Mexico City, Mexico

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

NOMBRE: Remedios Yolanda
Vera Mantenegro

FECHA: 05. Abril-05

FIRMA: [Firma manuscrita]

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA