



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“COMPARACIÓN DE LA EFICACIA FASCIOLICIDA DEL COMPUESTO ALFA-
INYECTABLE VS CLOSANTEL-INYECTABLE EN BOVINOS INFECTADOS EN
FORMA NATURAL”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

ALDO GUSTAVO GUZMÁN NOGUEZ

ASESOR: Dr. Froylán Ibarra Velarde (Asesor principal)

Dra. Yolanda Vera Montenegro (Co-Asesor)



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores Dr. Froylán Ibarra Velarde y Dra. Yolanda Vera Montenegro quienes a través de sus conocimientos y experiencia supieron guiarme para que este proyecto fuese realizado y por tener la confianza en mí para realizarlo.

A mi honorable jurado:

MVZ. Héctor Quiroz Romero

MVZ. Luis Ocampo Camberos

MVZ. Filemon Cruz Ceballos

MVZ. Froylán Ibarra Velarde

MVZ. Cintli Martínez Ortiz de Montellano

Al MVZ. Valentín Gómez Agüero y al Ing. José Arturo Simonin Cano por su participación en la parte experimental de este proyecto.

A la asociación ganadera de Acayucan, Veracruz por apoyar en el logística de este proyecto.

A la DEGPA – UNAM por el apoyo financiero otorgado a través del proyecto PAPIIT con clave No. RT201015.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por la formación y educación que me brindó.

CONTENIDO	
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
JUSTIFICACION	17
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	17
MATERIAL Y METODOS	18
RESULTADOS	20
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIÓN	32
REFERENCIAS	33

RESUMEN

GUZMÁN NOGUEZ ALDO GUSTAVO. "Comparación de la eficacia fasciolicida del compuesto alfa-inyectable vs closantel-inyectable en bovinos infectados en forma natural". (Bajo la dirección de: Dr. Froylán Ibarra Velarde y Dra. Yolanda Vera Montenegro).

El objetivo del estudio fue comparar la eficacia Fasciolicida entre el profármaco del compuesto Alfa presentación inyectable y un producto comercial closantel (Closantil® - Chinoín) inyectable, a través del porcentaje de reducción de huevos de *Fasciola hepatica* en bovinos infectados en forma natural. Se utilizaron 18 bovinos, de sexo indistinto entre 1 y 3 años de edad, diagnosticados positivos a la infección en forma natural por *Fasciola hepática* por la prueba de sedimentación. Seguidamente los bovinos se dividieron en 3 grupos de 6 individuos para realizar el tratamiento. El grupo 1 recibió el profármaco del compuesto alfa-inyectable a una dosis de 6 mg/Kg vía intramuscular. El grupo 2 recibió closantel a una dosis de 10 mg/Kg vía subcutánea. El grupo 3 fungió como testigo sin tratamiento. Se analizaron las heces de los bovinos en estudio en los días 0, 7, 14, 21 y 28 postratamiento utilizando la prueba de sedimentación. La eficacia fue medida como porcentaje de reducción de huevos de *F hepatica* con relación al grupo testigo sin tratamiento. Los resultados obtenidos mostraron un porcentaje de reducción de huevos del trematodo para el compuesto alfa inyectable de 88.2%, 87.3%, 90.7% y 88.5% para los días 7, 14, 21 y 28 respectivamente y para closantel de 93.2%, 95.8%, 95.6% y 89.4%, respectivamente. Al final del estudio se incubaron los huevos remanentes tanto del grupo testigo como de los tratados, para conocer el porcentaje de eclosión el cual en el caso del compuesto alfa disminuyó de forma significativa con relación al testigo sin tratamiento. Se concluye que el profármaco del compuesto alfa inyectable mostró una eficacia similar al compuesto de referencia (closantel), observando al final del estudio la aparición de algunos huevos de *Fasciola* posiblemente debida a *Fasciolas* juveniles que al final del estudio alcanzaron madurez y empezaron a producir huevos, razón por la que la eficacia valorada en porcentaje de reducción de huevos fue ligeramente menor a lo esperado.

II. INTRODUCCIÓN

La fasciolosis es una enfermedad zoonótica parasitaria, distribuida mundialmente e importante del ganado, la cual se debe a la presencia y acción en conductos biliares y vesícula biliar del trematodo *Fasciola hepatica*. Produce principalmente inflamación en el hígado y conductos biliares de gran cantidad de animales herbívoros (ovinos, bovinos, caprinos equinos, conejos, venados, elefante, canguro, castor), ocasionalmente el hombre y otros animales silvestres. En general es un proceso crónico que produce trastornos digestivos y de la nutrición. (Bowman, 2011; Ibarra, 2011; Quiroz, 2016).

Esta trematodosis es considerada como la enfermedad hepática parasitaria más importante de los rumiantes, la cual afecta también al ser humano (Vera *et al*, 2011).

Importancia económica.- Su importancia radica en cuantiosas pérdidas económicas que genera a la ganadería nacional y mundial (Taylor *et al*, 2016).

En México esta parasitosis se ha diagnosticado en 29 estados y su control se realiza principalmente a través de productos fasciolicidas los cuales debido a sobredosificación y/o uso inadecuado están generando problemas de resistencia antihelmíntica en diversas partes del mundo (Álvarez *et al*, 2009).

Datos estimados en nuestro país muestran que de 36 millones de bovinos, la mitad están expuestos a la infección por *Fasciola sp*, debido a que el ganado se encuentra localizado en zonas tropicales, subtropicales y templadas. Sin embargo, estudios epidemiológicos muestran que alrededor de 5 millones están realmente infectados; y si se estima que un animal fascioloso pierde en su vida productiva aproximadamente 30 kg. de carne a un costo de \$150.00 por kilo, se obtiene una

pérdida global aproximada de \$ 22,500,000.00 (Ibarra, 2018 *comunicación personal*).

Por otro lado, si se estima el costo por pérdida del hígado decomisado a razón de \$30.00/kg multiplicado por 5 kg promedio de cada hígado y a su vez considerando los 5 millones de bovinos afectados, se genera una pérdida global de \$750,000.00 adicionales (Ibarra, 2018 *comunicación personal*).

Además se ha estimado que más de 300 millones de bovinos y 250 millones de ovinos del mundo pastorean en áreas donde *F. hepatica* está presente, produciendo pérdidas anuales de más de U\$S 3 billones (Olaechea, 2004).

Antecedentes históricos

Aun cuando es muy posible que *Fasciola hepatica* haya sido conocida desde la antigüedad por diversas culturas, no existe de ese período ninguna referencia escrita o testimonio al respecto, así diversos autores están de acuerdo en que la primera referencia escrita relativa a este organismo se debe a Jean de Brie en 1379, quien por encargo de Carlos V de Francia, escribió un tratado sobre la producción de lana, y en el hizo referencia tanto del organismo como de la enfermedad



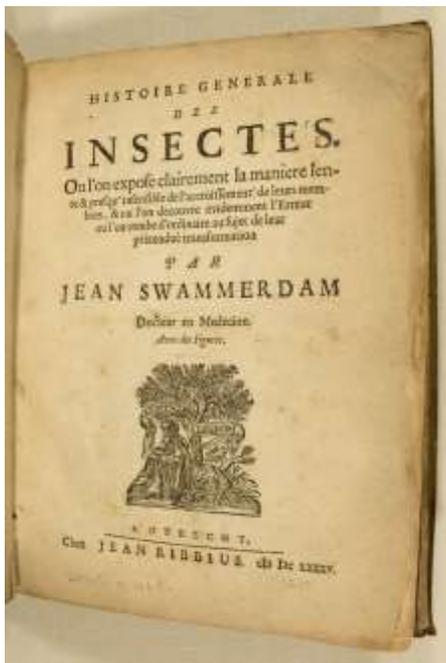
Fig. 3. Sheep liver worm (*Fasciola hepatica*) and deer head worm (*Cephenomyia rufibarbis*). Redi 1668:190; 1909:116

misma, refiriéndose a ella como mal del hígado. Posteriormente Sir Anthony Fitsherberit en 1523 dio la primera descripción en un libro titulado “Nuevo tratado

de máxima utilidad para todos los labradores”. La primera figura o dibujo de la duela del hígado aparece en 1668 en una publicación de Francesco Redí.

La primera publicación científica se realizó en 1737 por el Alemán Jean Swammerdam sobre los estadios de las formas inmaduras de *Fasciola hepatica* ya que encontró cercarias en un caracol al realizar una disección.

Posteriormente, Müller en 1773 (citado por Flores, 1986) al observar al microscopio el agua de los charcos, observó, estudió y escribió sobre el hallazgo de organismos microscópicos del tipo de los renacuajos, dándoles el nombre genérico de cercarias.



Esta enfermedad llegó conjuntamente con los bovinos y ovinos al continente americano con la conquista española, quienes al apoderarse de las nuevas tierras, los importaron de Europa, contaminados ya por *Fasciola*, e inadvertidamente transportaron también caracoles del genero *Lymnaea truncatula* (Carrada-Bravo, 2007; Ibarra, 2011).

Sinonimias

A la fasciolosis se le conoce popularmente como: Distomatosis hepática, Palomilla o Conchuela del hígado picado, Hígado podrido, Mal de botella, Saguaypé (en lengua guaraní gusano chato o plano), Gusano del hígado, duela de Hígado, Corrocho, Chonchaco (Peru). (Olaechea, 2004; Ibarra, 2011; Quiroz, 2016).

Morfología

El parásito adulto mide de 18 a 50 por 4 a 14 mm; el cuerpo es aplanado dorsoventralmente de forma foliácea, ancha anteriormente formando un cono posterior. Su cuerpo está cubierto por pequeñas espinas; posee una ventosa oral en el extremo superior, otra, la ventral a la altura de lo que podría llamarse “hombros” (Quiroz, 2016).

El trematodo es hermafrodita, los órganos internos que conforman el aparato digestivo y reproductor los cuales son muy ramificados, los dos testículos ocupan la parte media corporal cuenta con un ovario y el útero se localiza anteriormente a los testículos (Vera, 2011).

Los huevos miden de 130 a 150 por 63 a 90 micras, posee un opérculo; su cáscara es relativamente delgada, está teñida por pigmentos biliares de tonos amarillentos en su interior, donde entre numerosas células vitelinas yace el cigoto de color claro y de posición central (Bowman, 2011; Quiroz, 2016).

Ciclo biológico

Para completar su ciclo biológico *Fasciola hepatica* necesita dos huéspedes, uno intermediario (caracol) y otro definitivo (mamífero). En ambos, la población del parásito aumenta en gran escala, dentro del intermediario por la producción de cercarias y dentro del definitivo por la postura de huevos. El ciclo completo dura

alrededor de 5 meses, dependiendo de las condiciones climáticas (Olaechea, 2004).

El huésped intermediario es un caracol del género *Lymnaea* este molusco es anfibio y vive en aguas estancadas y poco profundas. Las temperaturas menores a 10°C, inhibe la actividad del caracol (Olaechea, 2004).

En México puede ser *L. bulimoides*, *L. cubensis*, *L. humilis*, además de *Fossaria humilis* como lo menciona Cruz *et al.*, 2002; en Centro y Sudamérica, *L. diaphena*, *L. truncatula* y *L. columella* (Ibarra, 2011, Quiroz, 2016).

La **Fasciola adulta** vive en los canalículos biliares del huésped definitivo, cada una de ellas produce por día alrededor de 20,000 huevos, estos a través de la bilis, llegan al intestino y son eliminados con la materia fecal.

En el exterior para su desarrollo los **huevos** necesitan de un medio hídrico (charcos, potreros inundables, canales de curso lento, etc.) y temperaturas que oscilan entre los 26° C que eclosionan en 9 días, pero a 10°C no se desarrollan, sin embargo, permanecen viables (Carrada-Bravo, 2007).

El **miracidio** (no puede vivir más de 24 horas en vida libre) es el resultado del desarrollo y la eclosión del huevo es un organismo ciliado que mide 150 por 40 micras, posee dos manchas oculares en forma de “X”, (que lo atraen hacia la superficie del agua), tiene una glándula y espolón cefálico (que lo ayudan a buscar y penetrar al caracol por la cavidad respiratoria o a través del tegumento del pie); al penetrar pierde su cubierta de cilios, se vuelve esférico, y sufre una serie de transformaciones llamadas **esporoquiste** ubicado en la glándula digestiva, que forman de 5 a 10 **redias** en el hepatopáncreas y a su vez forman más de 50 **cercarias**; después de 6 a 8 semanas las cercarias abandonan a las redias a

través de su abertura tocológica y al caracol por su aparato respiratorio (Vera *et al*, 2011 Quiroz, 2016).

Las **cercarias** liberadas (miden de 260 a 320 por 200 a 240 micras, sin considerar la cola propulsora que mide 500 micras de longitud), nadan activamente y se adhieren a la superficie de plantas y objetos que se encuentran. Estas fases se enquistan tomando el nombre de **metacercaria**. (es importante señalar que la metacercaria es la forma infectante) (Quiroz, 2016).

La infección del huésped definitivo se realiza por medio de la ingestión de alimentos como forraje verde y agua contaminados con metacercarias.

En el intestino se disuelve la membrana quística externa y queda libre el trematodo joven o adolescaria que mide 250 micras; este penetra activamente a través de la pared del intestino, alcanzando la cavidad peritoneal en aproximadamente 2 a 28 horas, permanece ahí de tres a quince días; después avanza por el peritoneo, llega a la cápsula de Glisson la cual penetra, y de 4 a 6 días después llega al parénquima hepático donde migra de 6 a 8 semanas, para finalmente asentarse en un conducto biliar y alcanza su estadio adulto. Una vez que los huevos son producidos inicia un nuevo ciclo evolutivo.

La vida del parásito en los conductos biliares de bovino es más o menos de un año, hay casos en que llega a vivir 6 o más años. Cuando se encuentran ejemplares de *Fasciola* adultas en la cavidad peritoneal, en el útero de vacas, o en el pulmón y tejido subcutáneo se trata de formas erráticas (Quiroz, 2016).

Las fasciolas jóvenes se nutren con sangre y tejido hepático; las adultas con sangre, bilis, y tejido epitelial proliferado (Quiroz, 2016).

Signos

Su presentación es aguda y crónica siendo que los ovinos parecen mostrar marcada sintomatología (Taylor *et al*, 2016).

Los signos clínicos en la presentación aguda se deben a la migración masiva de formas juveniles en el parénquima hepático y cavidad abdominal, en huéspedes muy afectados se puede observar depresión, anorexia, aislamiento, fatiga, ascitis, distención abdominal, problemas digestivos de tipo indigestión aguda, algunas veces con diarrea, palidez de las mucosas e ictericia. En ocasiones con elevada mortalidad en dos a tres días; otras veces evoluciona lentamente y le muerte sobreviene después de 6 a 9 días. (Bowman, 2011; Quiroz, 2016).

La evolución de la fasciolosis crónica es más lenta, debido en parte a una infección menor y a una mayor resistencia ligada a edad, reinfestación y estado nutritivo. En este caso, la anemia está presente y se acusan signos de caquexia, al tiempo de que se manifiestan edema en las porciones bajas, edema submandibular, el cual por lo general es más patente en la fasciolosis crónica (Quiroz, 2016).

Epidemiología

Aspectos epidemiológicos

En un área determinada para que se establezca la enfermedad, es necesaria la coincidencia del huésped intermediario y del definitivo, con temperaturas mayores a 10°C y humedad adecuada para el desarrollo del miracidio y de los estadios larvales en el caracol, por esto, durante el invierno no se desarrolla en casi ningún país, siendo en la primavera cuando se incuban todos los huevos.

Los hospedadores intermediarios de *F. hepatica* prefieren para su desarrollo zonas bajas y pantanosas con agua con poco movimiento pero, también pueden ser peligrosas las zonas con pequeños arroyos y manantiales. Los terrenos que se riegan con frecuencia y las zonas de agua corriente pueden también estar infestados de cercarias (Olaechea, 2004).

Epidemiología de fasciolosis en México

La enfermedad se presenta en casi toda la República Mexicana, y tiene su mayor prevalencia en zonas tropicales y templadas (Quiroz, 2016); sin embargo, su frecuencia varia de una región a otra, debido principalmente a la presencia de caracoles de los géneros *Lymnaea Fossaria* y *Galba* (Cruz et al., 2002).

La prevalencia de fasciolosis es variable y depende de hábitats primarios o secundarios de caracoles, en el primer caso la infección puede ocurrir durante todo el año, como en la zona costera del golfo de México, y el segundo caso posible se limite en las zonas endémicas del altiplano en donde la temperatura es superior a 10°C (Quiroz, 2016). Una situación similar a las zonas secundarias de caracoles puede suceder en las áreas de riego de México que favorecen los factores que permiten el desarrollo del ciclo biológico de *F. hepatica*.

La presencia y prevalencia de fasciolosis en México es variable, en los estados que se presenta con mas del 10 % son Tabasco y Veracruz; del 1 al 10 % son el Edo. México, Oaxaca y Chiapas y con menos del 1% están Guanajuato, Michoacán, San Luis Potosí, Querétaro, Chihuahua, Zacatecas y Sonora (Quiroz y Castellanos, 1991).

Actualmente se considera que en todo el país existen informes de *F. hepatica* con diversas prevalencias; excepto en Coahuila, la península de Yucatán y Baja

California Sur debido a sus características climatológicas y tipo de suelo calcáreo (Rangel y Martínez, 1994).

Control

Las medidas de control de *F. hepatica* se basan en 3 puntos:

1. Control de los estadios libres del parasito
2. Control de los huéspedes intermediarios (caracoles)
3. Control del parásito en el huésped definitivo

Control de los estadios libres del parasito

Para evitar que los animales ingieran las metacercarias del pasto se recomienda la rotación de potreros en combinación con los tratamientos.

Drenado de terrenos inundados, el cercado de terrenos con caracoles intermediarios que a su vez están contaminados con metacercarias, entre otras.

Control de los huéspedes intermediarios

Se debe basar previa localización de las colonias de caracoles, es difícil y ecológicamente cuestionable. Una de las medidas es mediante la aplicación de sustancias químicas en este caso llamadas molusquicidas.

En áreas endémicas se ha utilizado el sulfato de cobre. Es recomendable la primera aplicación al inicio de la primavera, para eliminar las poblaciones que sobrevivieron al invierno. La ventaja en esta época es que hay poca vegetación y esto facilita el contacto entre el molusquicida y el caracol, la desventaja es que los hábitats aún están muy húmedos siendo difícil el acceso y mayor la cantidad de molusquicida a usar. Una segunda aplicación podría realizarse al final del verano u otoño, con el objeto de eliminar la progenie de los sobrevivientes a la primera

aplicación. Es de destacar que el uso de químicos conlleva riesgos tales como acumulación de residuos tóxicos en agua y suelo, además del efecto negativo en la fauna circundante, por lo que el sulfato de cobre no se recomienda en donde hay población de bovinos.

Control del parásito en el huésped definitivo

El uso de antihelmínticos, tiene como objetivo eliminar el agente causal de la enfermedad e interrumpir la excreción de los huevos por materia fecal, así como prevenir que se contamine la pastura y los caracoles.

La alternativa usualmente utilizada para control de la fasciolosis es el tratamiento químico cuando el parásito se encuentra dentro del huésped y para ello se han empleado durante décadas diferentes fasciolicidas los cuales se agrupan en 5 grupos químicos:

1.-Fenoles halogenados

Hexaclorofenol: Al entrar en la circulación general se une en alto porcentaje a proteínas plasmáticas; se metaboliza y elimina por bilis lo cual resulta de utilidad contra los trematodos que se encuentran en los conductos biliares.

Bitionol: Inhibe la fosforilación oxidativa, lo que disminuye el metabolismo glucolítico del parásito. Altera el equilibrio digestivo excretor e interfiere en la embriogénesis del parásito, lo que permite usarlo como profiláctico.

Niclofolán: Derivado del hexaclorofenol se trata de un desacoplante de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias.

Nitroxinil: Actúa inhibiendo la fosforilación oxidativa, puede inducir el cese de inmediato de contracciones musculares del parásito.

2.-Salicilanidas.

Rafoxanida: Interviene en la formación de compuestos de alta energía, como ATP, ADP y otros, además de que transporta cationes a través de la membrana e interfiere en la fosforilación oxidativa en la mitocondria del parásito.

Closantel: Daña la cutícula del trematodo, causando erosiones en las fasciolas adultas. Bloquea las rutas energéticas, en especial la fosforilación oxidativa, causando graves trastornos en el metabolismo del parásito, que muere en uno o dos días. En las fasciolas sobrevivientes produce un efecto atrófico que imposibilita sus funciones de crecimiento y reproducción.

3.-Bencimidazoles.

3.1 bencimidazoles carbamatos

Albendazol: Inhibe la polimerización de la tubulina y la enzima reductasa de fumarato, lo que produce deficiencia en la generación de energía y por lo tanto la muerte del parásito. Sin embargo este compuesto solo mata fasciolas adultas desde 12 semanas de edad, lo que indica que no siempre se corta el ciclo evolutivo pues una fasciola en bovinos es adulta a las 10 semanas de edad.

3.2 Probenzimidazoles

Netobimina: Este fármaco es convertido por la microflora gastrointestinal en un metabolismo sulfóxido y posteriormente en el hígado sufre otra conversión que da como resultado la formación de albendazol y albendazol sulfóxido, estos productos son los que confieren la actividad antihelmíntica. Sin embargo se sabe que el Netobimin como fasciolicida tiene baja efectividad por lo que su uso como fasciolicida es limitado.

3.3 Bencimidazoles halogenados.

Triclabendazol: Su mecanismo de acción consiste en unirse a la tubulina bloqueando el paso de la glucosa al parásito, con la consecuente disminución de glucógeno y ATP. Importante de hacer notar es que este compuesto fasciolicida es reconocido a nivel mundial como el mejor fasciolicida en virtud de tener la capacidad de remover fasciolas en todos los estadios evolutivos.

4.- Sulfonamidas.

Clorsulon: Inhibe enzimas que participan en la obtención de energía y actualmente es un compuesto que al combinarse con ivermectinas tiene la dualidad de remover fasciolas y vermes gastrointestinales.

5.- Fenoxialcanos.

Diamfenetida: Este fármaco requiere activación en el hígado con lo que forma un metabolito activo, el cual produce cambios en tegumento que hacen susceptible al parásito ante la acción de enzimas.

Dentro de ellos, los bencimidazoles han sido ampliamente utilizados particularmente el triclabendazol que salió al mercado en 1984 (Ecker et al, 1984). Sin embargo, un problema importante que atañe a estos compuestos, es la baja solubilidad acuosa (Cruz *et al*, 1994), lo cual limita a que solo puedan administrarse en suspensión, pastas, tabletas o bolos nutricionales, situación poco práctica cuando se manejan grandes cantidades de animales.

Recientemente, se ha logrado solubilizar a estos compuestos lo cual abre una nueva etapa para valorar su potencial fasciolicida en versión inyectable utilizando la vía intramuscular.

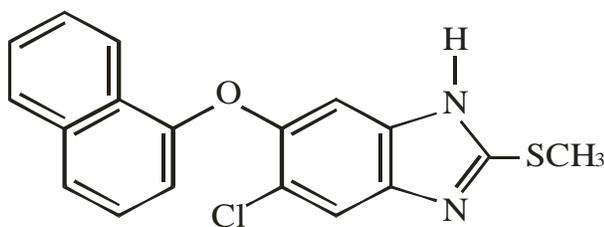
Antecedentes del compuesto Alfa

El compuesto Alfa o 5-cloro-2-metiltilio-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol (Hernández *et al*, 2002) es un derivado bencimidazólico que ha sido sintetizado a través de una colaboración inter-disciplinaria e inter-institucional entre las facultades de Química y Veterinaria de la UNAM el cual fue obtenido como parte de un programa de síntesis de nuevos compuestos antihelmínticos dirigidos contra *Fasciola hepatica*.

Información técnica.

Es un polvo blanco cristalino con ligero olor característico a azufre, con un peso molecular de 340.86. Su punto de fusión es de 171 – 179°C, presenta un Pka de 2.879, muestra características de ácido débil. Su coeficiente de partición aparente en octanol/agua es 27.63 (log P = 1.44)9 y su fórmula condensada es C₁₈H₁₃ClN₂OS.

Estructura química del compuesto Alfa:



Dicho compuesto formulado en suspensión oral, ha generado resultados promisorios a través del desarrollo de diversas pruebas toxicológicas, farmacocinéticas y de evaluación biológica con eficacia similar a los mejores fasciolicidas disponibles en el mercado a nivel mundial (Ibarra-Velarde *et al*, 1997; Ibarra-Velarde *et al*, 1997a; Ibarra-Velarde *et al*, 2000; Vértiz, 2000; Vera, *et al*, 2001; Rivera *et al*, 2002; Hernández *et al*, 2002; Ayala, 2003; Vera Montenegro *et*

al, 2003; 2004; Rivera et al, 2004; Ibarra-Velarde et al, 2004; Ibarra et al, 2005; Rivera et al, 2005; Vera et al, 2006; McConville et al, 2006; McConville et al, 2007; Ramírez et al, 2008; Rivera 2008; McConville et al, 2012).

Hoy en día, la solubilización del compuesto Alfa se ha logrado en muy alto porcentaje (Flores et al, 2014), por lo que se requiere realizar diversas pruebas de actividad biológica, farmacocinética y toxicidad en ovinos, bovinos y animales de laboratorio a fin de conocer las bondades y/o defectos del citado compuesto bajo estudio.

Por otra parte McConville et al., (2012) realizó un estudio en donde se infectaron ovejas con la cepa Collompton resistente al triclabendazol y fueron tratadas con el compuesto alfa a una dosis de 15 mg/ Kg, 12 semanas después de la infección. Se recuperaron fasciolas adultas de los conductos biliares a las 24, 48 y 72 horas post-tratamiento para su análisis histológico y al microscopio de transmisión electrónica del sistema reproductor femenino, específicamente útero, glándula de Mellis y ovario. El estudio señala que se producen cambios significativos en estos órganos por lo consiguiente disminuye la producción de huevos a las 24 horas después del tratamiento y es más evidente a las 72 horas

El principal hallazgo de este estudio es que la producción de huevos cesa a las 24 horas postratamiento, contiene células vitelinas pero no huevos con cáscara, no ensamblan a huevos normales y el útero está vacío y desprovisto de células.

Los tejidos reproductivos son especialmente sensibles a la acción del compuesto alfa (Colhoun, 1998) se encontraron ovarios mal formados, mal formación de huevos y el testículo después del tratamiento fué el más gravemente afectado (Colhoun, 1998).

El proceso de formación del huevo es más sensible a la acción del fármaco.

Dado que el compuesto alfa es un derivado bencimidazólico es capaz de producir alteraciones del tejido en cepas resistentes al triclabendazol (Fairweather, 2009).

Estos resultados tienen repercusión importante con respecto a la evaluación de los datos de eficacia basados únicamente en conteo de huevos en heces.

El compuesto alfa afecta al trematodo de forma similar al triclabendazol pero muestra algunas diferencias lo que puede ser una alternativa viable con la modificación adecuada (Munguia-Xochihua, 2009).

El otro problema que enfrenta el control exitoso de la enfermedad es que las duelas se están volviendo resistentes al triclabendazol. Por esta razón parece que los ganaderos están cambiando a drogas alternativas como el closantel y el nitroxinil aunque estos medicamentos son efectivos solo contra las infecciones de trematodos adultos.

Estos factores resaltan la necesidad de desarrollar nuevos medicamentos, y nuevas formulaciones que conlleven a mejorar la eficacia y la vía de administración.

JUSTIFICACION

Tradicionalmente los productos existentes para el control de la fasciolosis son compuestos químicos que cada vez son menos eficaces en virtud de los problemas de resistencia antihelmíntica que se van presentando por uso inadecuado de estos fármacos.

El último fasciolicida lanzado al mercado en 1983 fue el triclabendazol, por lo que se requieren mayores esfuerzos para buscar una nueva alternativa para enfrentar esta enfermedad de carácter mundial.

Por lo mencionado anteriormente el contar con un compuesto fasciolicida para administración intramuscular sería un avance en la quimioterapia de la fasciolosis.

III. HIPÓTESIS

El porcentaje de reducción de huevos de *Fasciola hepatica* en bovinos infectados en forma natural será mayor del 95% tanto en animales tratados con el compuesto Alfa- inyectable como con closantel.

IV. OBJETIVO

Comparar la eficacia fasciolicida del compuesto alfa-inyectable con closantel-inyectable a través de la reducción del porcentaje de huevos del parásito en bovinos infectados en forma natural.

V. MATERIAL Y METODOS

Localización del estudio.- El estudio se realizó en el rancho “La Piedra”, localizado en Chinameca, Veracruz (a 40 kilómetros de Acayucan).

Animales.- Se utilizaron 18 bovinos criollos de sexo indistinto entre 1 y 3 años infectados en forma natural con *Fasciola hepatica* y determinados como positivos al trematodo a través de exámenes copromicroscópicos utilizando la técnica de sedimentación (Rodríguez, 2015).

Fármacos: Compuesto Alfa-inyectable sintetizado por el grupo de investigadores de la Facultad de Química de la UNAM formulado para administración intramuscular y Closantel al 5% (Closantil® - Chinoin) para administración subcutánea.

Conducción del estudio.- En el día 0, los bovinos seleccionados fueron divididos en 3 grupos de 6 animales cada uno.

En el día 0 el Grupo 1 recibió el compuesto Alfa-Inyectable a una dosis única de 6 mg/kg/vía IM.

El Grupo 2 recibió closantel inyectable a una dosis única recomendada por el fabricante (10 mg/Kg/vía subcutánea).

El grupo 3 fungió como testigo infectado sin tratamiento y solo se le administró agua por vía intramuscular en una dosis igual a la aplicada al grupo 1.

Análisis coprológico.- Se analizaron las heces de los bovinos en estudio en los días 0, 7, 14, 21 y 28 postratamiento utilizando la técnica de sedimentación (Rodríguez, 2015).

Estimación de la eficacia.- La eficacia fue medida como porcentaje de reducción de huevos de *F. hepatica* con relación al grupo testigo sin tratamiento de acuerdo a las reglas de evaluación de antihelmínticos sugerida por la World Association for Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) (Rodríguez, 2015).

Para ello se utilizó la siguiente formula:

$$\% \text{ Eficacia} = \frac{\text{Promedio de huevos en el grupo testigo} - \text{Promedio de huevos en el grupo tratado}}{\text{Promedio de huevos en el grupo testigo}} \times 100$$

Análisis estadístico.- la información obtenida fue sometida a un análisis de varianza (ANDEVA) con el paquete estadístico IBM SPSS STATISTICS (VERSION 23-2015) para detectar si existían diferencias estadísticas entre los grupos experimentales.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se pueden observar en los Cuadros 1 y 2, así como en las Figuras 1, 2 y 3.

Porcentaje de reducción de huevos.

Grupo 1 (profármaco del compuesto Alfa) al realizar la prueba de sedimentación se puede observar que en el día 0 (antes del tratamiento) el número total de huevos presentes fue de 176, con un mínimo de 14 un máximo de 58 y un promedio de 29.3 huevos en el grupo. Para el día 28 (fin del estudio) el número total de huevos de *Fasciola* encontrados fue de 52 con un mínimo de 5, un máximo de 14 y un promedio de 8.6 huevos en el grupo (Cuadro 1 y Fig. 1).

Grupo 2 (closantel) se puede observar que en el día 0 (antes del tratamiento) el número total de huevos presentes fue de 184, con un mínimo de 4, un máximo de 88 y un promedio de 30.6 huevos en el grupo. Para el día 28 el número total de huevos de *Fasciola* encontrados fue de 48 con un mínimo de 1, un máximo de 14 y un promedio de 8 huevos en el grupo (Cuadro 1 y Fig. 1).

Grupo 3 (testigo sin tratamiento). En el día 0 (antes del tratamiento) el número total de huevos presentes fue de 418, con un mínimo de 21, un máximo de 141 y un promedio de 69.6 huevos en el grupo. Para el día 28 el número total de huevos fue de 456 con un mínimo de 12 un máximo de 144 y un promedio de 76 huevos en el grupo (Cuadro 1 y Fig. 1).

Eficacia de los compuestos

Profármaco del compuesto Alfa.-

Los porcentajes de eficacia obtenidos para este compuesto aplicado a la mitad de la dosis de su compuesto antecesor, fueron de 88.2%, 87.3%, 90.7% y 88.5%, para los días 7, 14, 21 y 28 postratamiento, respectivamente. (Cuadro 2 y Fig. 2).

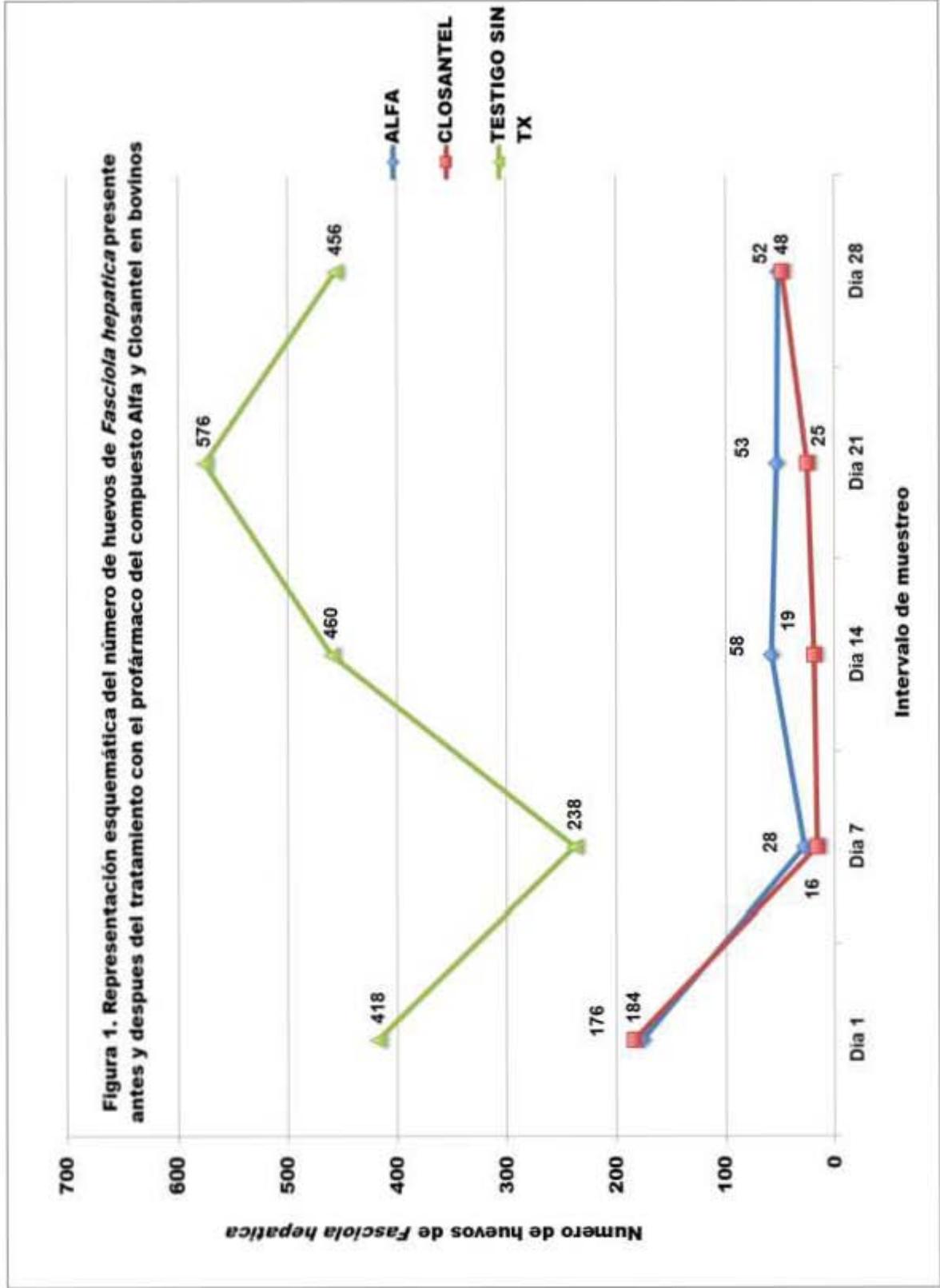
En el caso del grupo de bovinos tratados con Closantel por vía subcutánea, la eficacia conferida fue ligeramente mayor, en el orden de 93.2%, 95.8%, 95.6% y 89.4%, respectivamente (Cuadro 2 y Figura 2).

El análisis estadístico indicó que no hay diferencia estadística entre la eficacia ejercida por ambos compuestos, ni tampoco al analizar la eficacia entre intervalos de tiempo ($p < 0.05$).

Es importante señalar que estos porcentajes de eficacia se encuentran dentro de los rangos esperados pues tanto el compuesto alfa como el closantel muestran tener menor eficacia contra estadios juveniles del parásito y como ya se mencionó los bovinos en estudio tenían una infección adquirida de *Fasciola hepatica* en forma natural, por lo se desconocía en que porcentaje los bovinos estaban parasitados con estadios juveniles o inmaduros.

Porcentaje de eclosión de huevos de Fasciola.- Con relación a este parámetro evaluado antes y después del tratamiento, se pudo apreciar que ambos compuestos inhibieron el porcentaje de eclosión desde el día 7 postratamiento, en comparación a los huevos producidos por el grupo testigo sin tratamiento. En lo concerniente a closantel, este compuesto mostró un porcentaje de inhibición mayor, pues desde el día 14 hasta el final del estudio los huevos de Fasciola producidos en este grupo alcanzaron un 100% de inhibición. El grupo testigo siempre mantuvo el alto porcentaje de eclosión de huevos del trematodo (Fig. 3).

Cuadro 1.-Análisis coprológico de huevos de <i>Fasciola hepatica</i> antes y después del tratamiento en bovinos infectados en forma natural.								
Grupo y concentración	Bovino No.	Peso (Kg)	Dosis (ml)	Número de huevos de <i>Fasciola hepatica</i>				
				Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
Alfa 6mg/kg/ vía IM	1	153	10	58	5	16	12	7
	2	382	25	14	0	9	6	7
	3	336	22	18	4	4	13	11
	4	336	22	24	0	13	12	14
	5	229	15	42	14	12	7	8
	6	290	19	20	5	4	3	5
TOTAL				176	28	58	53	52
PROMEDIO				29.3	4.6	9.6	8.8	8.6
Closantel 5% 10 mg/kg subcutaneo	7	230	23	12	1	1	2	1
	8	220	22	88	1	4	8	13
	9	300	30	16	5	3	1	7
	10	400	40	4	3	2	3	7
	11	300	30	44	2	2	4	6
	12	300	30	20	4	7	7	14
TOTAL				184	16	19	25	48
PROMEDIO				30.6	2.6	3.1	4.1	8
Testigo sin tratamiento	13	280	'---	36	34	20	15	12
	14	270	'---	21	23	26	17	21
	15	320	'---	44	47	41	46	61
	16	290	'---	49	57	96	187	127
	17	340	'---	127	35	174	159	91
	18	300	'---	141	42	103	152	144
TOTAL				418	238	460	576	456
PROMEDIO				69.6	39.6	76.6	96	76



Cuadro 2. Eficacia fasciolicida del profármaco del compuesto Alfa aplicado vía intramuscular y closantel vía SC en bovinos infectados en forma natural					
GRUPO/ COMPUESTO	<i>PORCENTAJE DE EFICACIA</i>				
	<i>Día 0</i>	<i>Día 7</i>	<i>Día 14</i>	<i>Día 21</i>	<i>Día 28</i>
ALFA 6mg/kg/IM	0	88.2	87.3	90.7	88.5
CLOSANTEL 10mg/kg/sc	0	93.2	95.8	95.6	89.4
TESTIGO	0	0	0	0	0

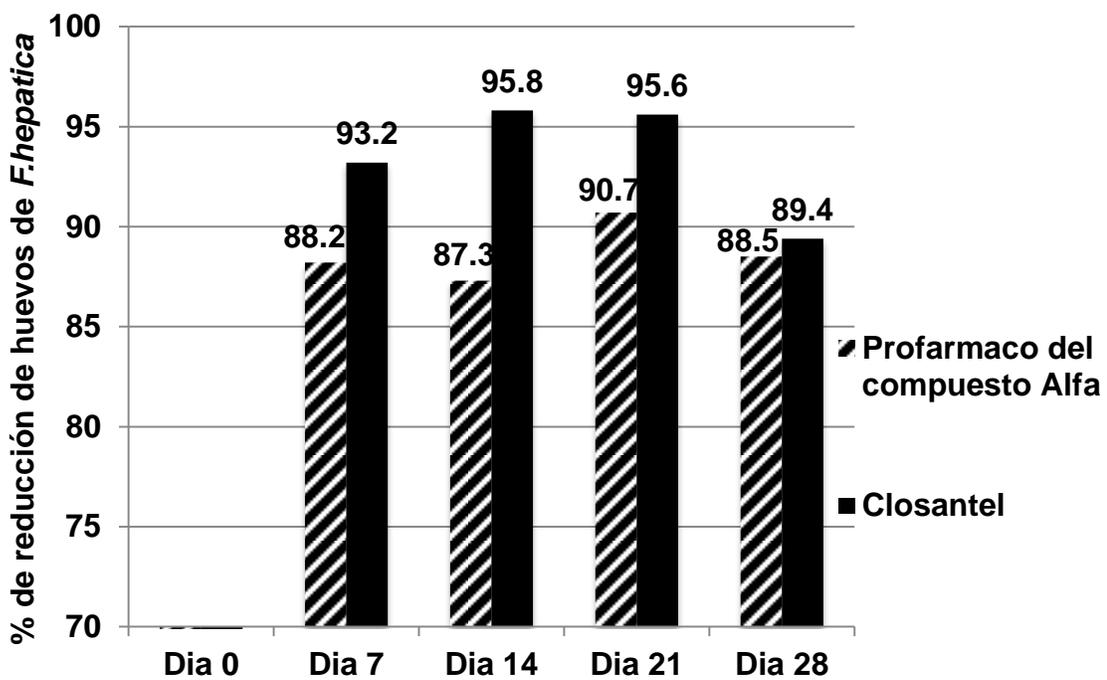
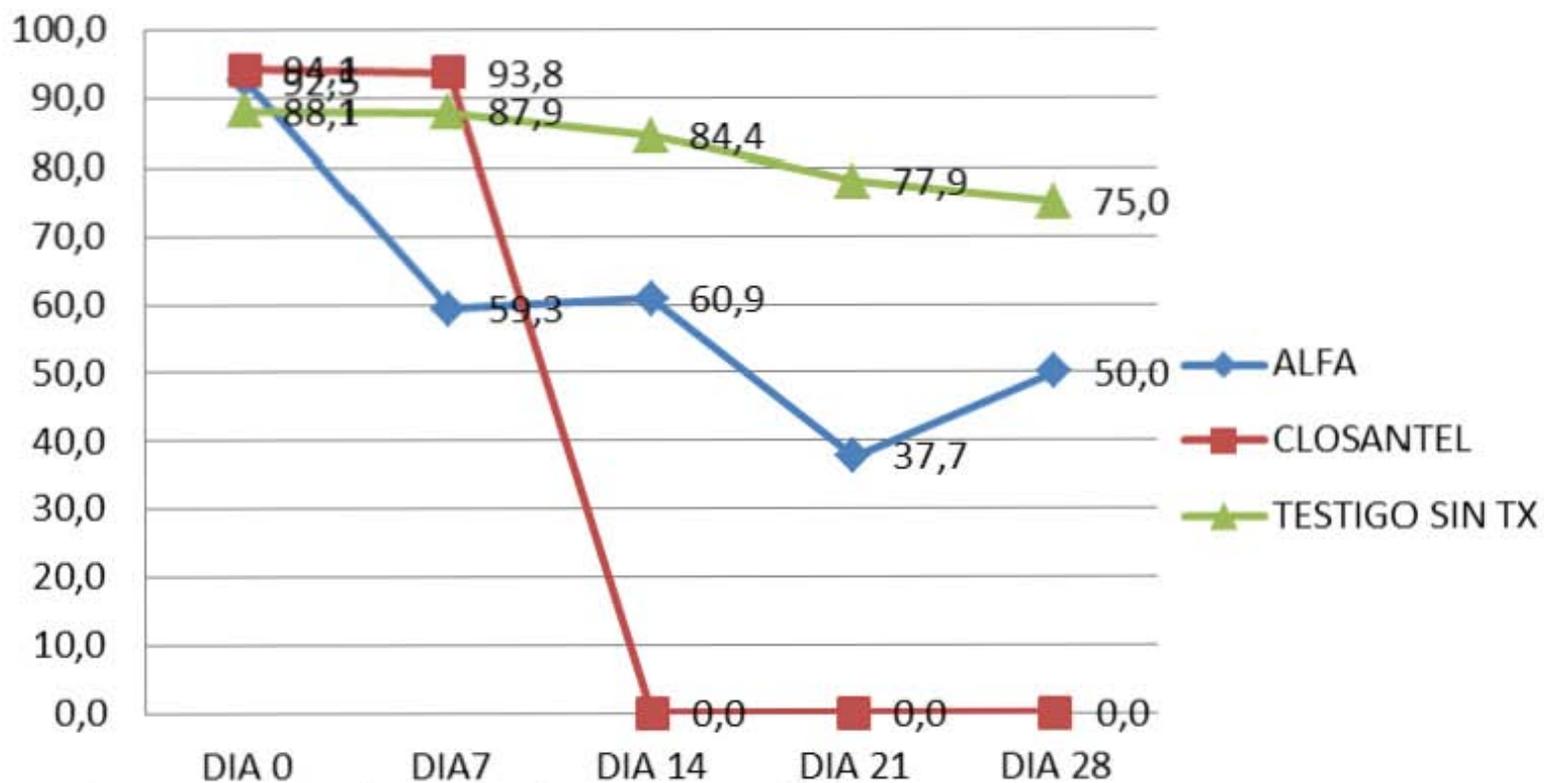


Figura 2. Eficacia fasciolicida del profármaco del compuesto alfa comparado con closantel evaluado como porcentaje de reducción de huevos en bovinos infectados en forma natural

Fig. 3 Porcentaje de eclosion de huevos de *Fasciola hepatica* antes y despues del tratamiento con el compuesto Alfa y Closantel administrado por via parenteral.



*No se encontraron huevos de *F. hepatica* a partir del dia 14 postratamiento.

El análisis estadístico confirmó la normalidad en la distribución de los resultados y homogeneidad de varianza para los días 7, 21 y 28 y nos permitió realizar la prueba de ANOVA. Para el día 14 se realizó la prueba de Kruskal Wallis.

Los resultados enmarcados en el cuadro 3, nos demuestran que no hay significancia estadística entre tratamientos para los días 7 y 28, más no así para los días 14 y 21 los cuales indican que para el comienzo del estudio y el final de este los tratamientos tienden a comportarse de manera similar.

Asimismo se confirma que el grupo control es totalmente diferente de los grupos tratados.

Cuadro 3. Evaluación estadística de la comparación entre tratamientos.					
GRUPO/	COMPUESTO				
		<i>Día 7</i>	<i>Día 14</i>	<i>Día 21</i>	<i>Día 28</i>
ALFA	6mg/kg/IM	a	b	b	a
	CLOSANTEL 10mg/kg/sc	a	b	b	a
	TESTIGO	c	c	c	c

a,b,c = Literales distintas son estadísticamente diferentes ($p > 0.05$).

DISCUSIÓN

El parasitismo interno de los bovinos es considerado un factor que limita la producción de los animales y la producción ganadera en México. El problema se agrava cuando las prácticas de prevención y control son poco efectivas debido a la carencia de enfoques técnicos.

Durante varias décadas se han utilizado diversos sistemas de control para disminuir la prevalencia de fasciolosis, sin embargo, no existe duda de que al momento el tratamiento químico utilizando compuestos fasciolicidas sigue siendo la forma más efectiva para controlar la fasciolosis en ovinos y bovinos.

Por otro lado, la resistencia a los antihelmínticos se está extendiendo en el mundo, constituyendo un problema que preocupa, debido a que complica cada vez más el control de la fasciolosis en los rumiantes, particularmente en el ganado bovino.

Mas-Coma et al., (2009) mencionan que la incidencia de la fasciolosis continuará aumentando en el futuro y de acuerdo a la tendencia observada se atribuye en parte al cambio climático.

Como se menciona en algunos estudios el compuesto alfa formulado para administración oral ha mostrado alta eficacia tanto en evaluaciones *in vitro* como *in vivo* en ovinos y bovinos. Sin embargo, aun cuando la eficacia obtenida en diversos estudios es alta, no se había dado continuidad por la razón de que se trata de un fasciolicida experimental para administración oral que muestra resultados muy similares a los fasciolicidas comerciales.

Fue hasta el 2014 cuando Flores y colaboradores, en un experimento realizado en 24 ovinos adultos infectados experimentalmente con *F. hepatica*, observaron que al administrar el compuesto Alfa a grupos de 6 animales c/u por vía oral, subcutánea e intramuscular a dosis de 12 mg/kg, 4 mg/kg/IM y 4 mg/kg/SC, respectivamente, obtuvieron resultados de eficacia altos y muy similares.

La relevancia del presente estudio radica prácticamente en que se está usando la mitad de la dosis utilizada para administración oral en donde se aprecian las siguientes ventajas:

1. Facilita la aplicación y manejo en un mayor número de animales lo cual da ventaja sobre la administración por vía oral.
2. Disminuye el riesgo para el MVZ o persona que va a desparasitar.
3. Menor stress en los animales que van a ser desparasitados por vía IM.
4. Los bovinos no muestran irritación ni efectos adversos en el momento ni después del tratamiento.
5. Facilidad y rapidez para el operador al administrar tratamientos por vía IM.
6. Disminuye la contaminación por razones de eliminación de menor cantidad del químico en el campo, situación que hoy en día es muy cuestionada por los ecólogos y ambientalistas a nivel mundial.

Por lo anteriormente señalado el contar con un fasciolicida inyectable es necesario ya que al no ser todavía utilizado bajo condiciones de campo la posibilidad de emergencia de resistencia a este compuesto sería mas tardada.

Con relación a la eficacia conferida por esta formulación intramuscular se observó que el porcentaje de reducción de huevos de *Fasciola* fue ligeramente más bajo que con closantel, sin embargo, al realizar el estudio estadístico se observa que no hubo diferencia significativa entre tratamientos.

La información obtenida concuerda con previos estudios realizados con el compuesto alfa en administración oral y en pruebas controladas con infección experimental. En el presente experimento, lo que se puede interpretar es que como los bovinos en estudio tenían una infección natural se desconocía en que porcentaje estaban parasitados con *Fasciolas* inmaduras, juveniles y/o adultas lo cual podría ser la razón por la cual al evaluar el experimento al final del estudio se observó la aparición de huevos posiblemente producidos por fasciolas que alcanzaron su madurez y que no fueron removidas por el compuesto alfa al momento del tratamiento.

Una interpretación similar concierne para closantel en virtud de cómo se ha señalado, este compuesto es solamente eficaz contra fasciolas de 6 semanas de edad en adelante y posiblemente algunas *Fasciolas* que alcanzaron madurez liberaron huevos y por ende el compuesto no confirió una eficacia que alcanzara el 100%.

El presente estudio sobre este profármaco es una contribución modesta realizada como prueba de campo, pero muy importante porque ayuda a recabar información que conjuntamente con otros estudios de evaluación biológica y toxicidad determinarán las bondades o defectos de este compuesto experimental. Futuros

estudios relacionados con evaluaciones biológicas, farmacocinéticas y de toxicidad mostrarán el real potencial fasciolicida del profármaco del compuesto alfa inyectable, para saber si el compuesto puede ser utilizado en el control de la fasciolosis en ovinos y bovinos.

Cabe mencionar que el profármaco del compuesto alfa está bajo trámite de patente ante el Instituto Mexicano de la Producción Industrial (IMPI) el cual está protegido por la UNAM tanto en México como a nivel internacional USA, Brasil, Chile y Perú. Se espera que en futuro cercano esta patente sea liberada para realizar la correspondiente cesión de derechos a la industria privada.

CONCLUSION

El profármaco del compuesto alfa inyectable mostró una eficacia similar al compuesto de referencia (closantel), observando al final del estudio la aparición de algunos huevos de *Fasciola hepatica* posiblemente debida a *Fasciolas* juveniles que al final del estudio alcanzaron madurez y empezaron a producir huevos, razón por la que la eficacia valorada en porcentaje de reducción de huevos fue ligeramente menor.

VI. REFERENCIAS

1. ALVAREZ L, MORENO G, MORENO L, CEBALLOS L, SHAW L, FAIRWEATHER I, LANUSSE C. Comparative assessment of albendazole and triclabendazole ovicidal activity on *Fasciola hepatica* eggs. *Veterinary Parasitology*. 2009; 164: 211-216.
2. AYALA AS. Evaluación toxicológica del compuesto fasciolicida alfa en vacas gestantes. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 2003.
3. BOWMAN DD. *Georgis parasitología para veterinarios*. novena Edición. Editorial Elsevier. España 2011. PAG. 115-123.
4. CARRADA-BRAVO T. *Fasciola hepatica*: Ciclo biológico y potencial biótico. *Rev Mex Patol Clin*, Vol 54, Num. I, pp21-27 Enero – Marzo, 2007.
5. CRUZ MI, IBARRA VF, NARANJO GE, QUINTERO MT, Lecumberri LJ. Identificación taxonómica, estacionalidad y grado de infección con *Fasciola hepatica* de moluscos huéspedes y no huéspedes intermediarios del trematodo en el rancho de la Universidad Autónoma de Hidalgo, en Tulancingo, Hidalgo, México. *Vet Mex*, 33 (2) 2002 Pp. 189-200.
6. CRUZ, M C, BARTLETT MS, Edlind, T. D. In vitro susceptibility of the opportunistic fungus *Cryptococcus neoformans* to anthelmintic benzimidazole. *Antimicrobial Agents and Chemother* 1994; 38(2): 378-380.
7. ECKERT J, SCHNEITER G, WOLF K. Fasinex (triclabendazole) a new fasciolicide. *Berl. Munch. Tierarztl. Wschr* 1984; 91: 349-356.

8. FAIRWEATHER I, BORAY J.C. Fasciolicides: Efficacy, Actions, Resistance and its Management. The Veterinary Journal. 1999; 158(2): 81-112.
9. FLORES CR.: Antecedentes históricos y clasificación. En: Fasciolosis. Volumen Conmemorativo del Centenario del Descubrimiento del Ciclo de *Fasciola hepatica* Thomas y Leuckart 1883. Editado por: FLORES CR, QUIROZ RH, IBARRA VF. 335-403. *INIFAP-Sect Pecuario*, México, D.F., 1986. Pp. 10-12.
10. FLORES-RAMOS M, IBARRA-VELARDE FROYLÁN, DEL RIVERO LAURO, HERNÁNDEZ-CAMPOS ALICIA, VERA-MONTENEGRO YOLANDA, CANTÓ-ALARCÓN GERMINAL J. A highly water soluble benzimidazole derivative useful for the treatment of fasciolosis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2014; 24: 5814-5817. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.10.017>
11. 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(5): 649-652.
12. IBARRA VELARDE F, MONTENEGRO CRISTINO N, FLORES CRESPO J, HERNÁNDEZ CAMPOS A, CASTILLO BOCANEGRA R. Evaluación de 4 vehículos para formular un fasciolicida experimental. *Veterinaria Mexico.* 2000.31 (1) 47 - 51.
13. IBARRA VELARDE F, YOLANDA VERA, HÉCTOR QUIROZ, JORGE CANTÓ, RAFAEL CASTILLO, ALICIA HERNÁNDEZ, PEDRO OCHOA. Determination of the effective dose of an experimental fasciolicide in

- naturally and experimentally infected cattle. *Veterinary Parasitology* 2004: 120; 65-74.
14. IBARRA VELARDE F, YOLANDA VERA, RAQUEL LÓPEZ, GERMINAL CANTÓ, ALICIA HERNÁNDEZ, RAFAEL CASTILLO. Compound Alpha: Comparison of two fasciolicide formulation in cattle. *Intern. J. of Appl. Res. Vet. Med.* 2005.
 15. IBARRA VF, FIGUEROA CJA, QUIROZ RH. *Parasitología Veterinaria. Volumen II. Helmintos.* Editorial Castdel S.A, México D.F., 2011.
 16. IBARRA VF, GARCÍA SE, FERNÁNDEZ RM, VERA MY, CASTILLO BR, HERNÁNDEZ CA. Eficacia fasciolicida de dos compuestos de síntesis química *in vitro* e *in vivo* en ovinos. *Vet. Mex* 1997; 28: (4), 291-296.
 17. IBARRA VF, VERA MY, HERNÁNDEZ CA, CASTILLO BR. Eficacia fasciolicida del compuesto Alfa contra estadios juveniles y adultos en ovinos. *Vet. Mex* 1997a; 28: (4), 297-301.
 18. IBARRA VF. Avances de investigación en fasciolosis En: *Temas Selectos de Parasitología.* Ed. Héctor Quiroz Romero y Froylán Ibarra Velarde. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. 2000; Volumen 1: Pág. 40-46.
 19. MAS-COMA S, VALERO MA, BARGUES MD. Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. *Vet. Parasitol.* 2009; 163, 264-280.
 20. MCCONVILLE M, BRENNAN GP, MCCOY M, CASTILLO R, HERNÁNDEZ-CAMPOS A, IBARRA F, FAIRWEATHER I. Adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: surface and subsurface tegumental responses to *in vitro*

- treatment with the sulphoxide metabolite of the experimental fasciolicide compound alpha. *Parasitology* 2006; 133: 1-14.
21. MCCONVILLE M, BRENNAN GP, MCCOY M, CASTILLO R, HERNÁNDEZ-CAMPOS A, IBARRA F, FAIRWEATHER I. Immature triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: tegumental responses to in vitro treatment with the sulphoxide metabolite of the experimental fasciolicide compound alpha. *Parasitology Research* 2007: 100; 365-377.
22. MCCONVILLE, R.E.B. HANNA, G.P. BRENNAN, H.W.J. EDGAR, S. MCCONNELL, M. MCCOY, R. CASTILLO, A. HERNÁNDEZ-CAMPOS, I. FAIRWEATHER. Impact of compound alpha treatment in vivo on egg production by the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 187 (2012) 183– 195.
23. MUNGUÍA XJ. Evaluación *In vivo* e *in vitro* de fasciolicida experimental solubilizado con ciclodextrinas (tesis de doctorado en ciencias). D.F. (México) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 2009.
24. OLAECHEA FV. Red de Helminología de FAO para América Latina y el Caribe Conferencia Electrónica 2004, Septiembre 2004.
25. QUIROZ RH, CASTELLANOS HAA. Diagnóstico de la prevalencia de *Fasciola hepática* de bovinos sacrificados en empacadoras y rastros de México. En Quiroz RH, editor. Diagnóstico y control de parásitos de animales y el hombre. Universidad Nacional Autónoma de México y División del Sistema Universidad Abierta. Mexico, D.F. 1991; 335-360.

26. QUIROZ RH, Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. 10ª. ed. Limusa, México D.F. 2016.
27. QUIROZ RH. Epidemiología de Fasciolosis. En Control de enfermedades parasitarias en el ganado bovino. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. División de Educación Continua. Departamento de Parasitología. México; D.F. 1996.
28. QUIROZ RH. Epidemiología. En Flores CR, Quiroz RH, Ibarra VF. Editores. Fasciolosis, volumen conmemorativo del Centenario del Descubrimiento del Ciclo de *Fasciola hepática*. Instituto de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. México, D.F. 1986; 335-403.
29. RAMÍREZ, N., MAYET, L., DEL RIVERO L., IBARRA-VELARDE, F., CASTILLO, R. HERNÁNDEZ-CAMPOS, A. JUNG-COOK H. Pharmacokinetic behavior in sheep and cattle of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthylthio)-1H-benzimidazole, a new Fasciolicide Agent. J. Vet. Pharmacol. Therap. 2008; 32; 154-159.
30. RANGEL RIJ, MARTINEZ DE. Perdidas económicas por decomiso de hígados y distribución geográfica de la fasciolosis bovina en el estado de Tabasco, México. Vet Mex 1994; 25(4) 327-331.
31. RIVERA F.N.; Evaluación de la eficacia del compuesto alfa contra *Fasciola hepática* de diversas edades en ovinos. (Tesis de Maestría). México, D.F, México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 2008.
32. RIVERA FN, IBARRA VF, OLAZARÁN JS, VERA MY, CASTILLO BR, HERNÁNDEZ CA. Eficacia del 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthylthio)

- benzimidazole contra diversas edades de *Fasciola hepatica* en ovinos. Vet. Méx. 2002; 33(1): 55 – 61.
33. RIVERA NORMA, IBARRA FROYLÁN, ZEPEDA ARMANDO, FORTOUL TERESA, CANTÓ GERMINAL, HERNÁNDEZ ALICIA, CASTILLO RAFAEL. The effect of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1H-benzimidazole called compound alpha on the tegument of immature *Fasciola hepatica* in its natural host. Parasitology Research 2005; 95:379-382.
34. RIVERA NORMA, IBARRA FROYLÁN, ZEPEDA ARMANDO, FORTOUL TERESA, HERNÁNDEZ ALICIA, CASTILLO RAFAEL, CANTÓ GERMINAL. Tegumental surface changes in adult *Fasciola hepatica* following treatment in vitro and in vivo with an experimental fasciolicide. Parasitology Research 2004; 93: 283-286.
35. RODRÍGUEZ VRI. Técnicas para el diagnóstico de parásitos con importancia en salud pública y veterinaria. 1er edición. AMPAVE. Consejo Consultivo Nacional de Sanidad Animal. México 2015. Pág. 362, 363.
36. ROMERO JM, OLAZABAL ME, MARTINEZ Y, SERRANO H. Actividad fasciolicida *in vitro* de *Portulaca oleracea* L. *Acta Farm. Bonaerense* 2002; 21 (4): 297-300.
37. TAYLOR MA, COOP RL, WALL RL. Veterinary Parasitology. 4th Ed. Oxford Blackwell. Uk 2016.
38. VERA MONTENEGRO Y, 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. Parasitology Research 2004; 92: 211-214.
39. 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. Parasitology Research 2003; 91: 1- 4.
40. VERA MY, IBARRA VF, QUIROZ, RH, RIOS, UA, CASTILLO, BR, HERNÁNDEZ, CA. Eficacia del 6-cloro-2-metiltio-5-(1-naftiloxi) bencimidazol contra *Fasciola hepatica* de cuatro y diez semanas de edad en bovinos de México. Veterinaria México 2001; 32(1):77-80.
41. VERA MY. Fasciolosis en: Editores IBARRA VF, FIGUEROA CJA, QUIROZ RH. Parasitología Veterinaria. Volumen II. Helmintos Editorial Castdel S.A, México D,F, 2011: pag. 57.
42. VERA Y, IBARRA F, CANTÓ GJ, SORIA O, CASTILLO R, HERNÁNDEZ A. Determination of the Maximum Tolerated Dose and the Safety Index of an Experimental Fasciolicide in Cattle. J. Vet. Med. B 2006; 53: 145-149.
43. VÉRTIZ SG. Evaluación farmacocinética de α BIO10 en ganado vacuno. Tesis de Maestría en Farmacia (Biofarmacia). Facultad de Química. División de Estudios de Posgrado. UNAM. 2000.