



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DE UN FASCIOLICIDA
INYECTABLE

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:
ABEL ZAPATA ARENAS

TUTOR

Dr. Froylán Ibarra Velarde (FMVZ, UNAM)

COMITÉ TUTOR

Dr. Pedro Mendoza de Gives. (CENID-PAVET)

Dr. Luís Ocampo Camberos (FMVZ, UNAM)

México, CDMX, AGOSTO

2023



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.

DEDICATORIA

A mi esposa, quien ha estado en los momentos buenos y malos, que ha encontrado las palabras indicadas para levantarme los ánimos y seguir en adelante con este proyecto. Gracias por la espera en los tiempos en los que nos encontramos separados, pero más juntos que nunca. También te dedico esta tesis que es parte de nuestra historia juntos y será una de tantas anécdotas que serán contadas por alguno de los dos. Te AMO y eres parte de mis logros y fracasos que podamos tener el resto de nuestra vida.

A mis hijas Ana y Anel, ustedes son el motor de esta pequeña familia por lo que su mamá al igual que yo damos el 1000% de nuestro esfuerzo para ser un buen ejemplo pese a las tempestades y en los buenos momentos que han vivido, para que siempre los valores que les hemos forjado de honestidad, el respeto, generosidad, humildad, tolerancia, solidaridad, así como siempre tener una buena actitud se puede vivir tranquilo sin defraudar la confianza de nadie.

A mis padres, hermanos y sobrinos, me han apoyado y han confiado en los proyectos de vida, muchas gracias.

En memoria a Héctor Ariel Rico Morales por su amistad incondicional, así como sus enseñanzas tanto académicas como personales y en donde quiera que estes te dedico este éxito, el cual me ayudaste a terminar, muchas gracias Hectorino.

Contenido

RESUMEN	4
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	8
1.1 Morfología	8
1.2 Ciclo biológico.....	9
1.3 Epidemiología.....	12
1.4 Patología de la enfermedad.....	13
1.5 Control	14
MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
2.1- Fármaco	21
2.2. Toxicidad Aguda.....	21
2.2.1 Animales de laboratorio.....	21
2.2.2 Análisis bioquímico del suero y estudio hematológico	23
2.2.3 Análisis patológico.....	24
2.3. Toxicidad subaguda	25
2.3.1 Animales de laboratorio.....	25
2.3.2 Análisis bioquímico del suero y estudio hematológico	26
2.3.3 Análisis patológico.....	27
2.4 – Citotoxicidad.....	27
2.5 – Het Cam	29
RESULTADOS.....	30
3.1- Toxicidad aguda	30
3.2 Toxicidad subaguda	32
Citotoxicidad.....	42
Het Cam	45
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIÓN.....	49
BIBLIOGRAFÍA	50

RESUMEN

ABEL ZAPATA ARENAS. Estudios toxicológicos *in vivo* e *in vitro* de un fasciolicida inyectable.

El objetivo fue evaluar la toxicidad del compuesto alfa inyectable, por medio de estudios toxicológicos agudo y subagudo, de citotoxicidad y la prueba de het cam. Para la toxicidad aguda, se utilizó la guía OECD, No. 423 en donde se utilizaron 18 ratas hembras wistar Hsd Han, a las cuales se les administraron 2000 mg/kg (Grupo 1), 1000 mg/kg (Grupo 2), 500 mg/kg (Grupo 3), 100 mg/kg (Grupo 4), 10 mg/kg (Grupo 5) y agua inyectable (Grupo 6). Una vez inoculadas, se revisaron con detenimiento las primeras 4 horas después a las 24 hr y posteriormente cada día durante 14 días, para realizar análisis de hemograma, química sanguínea y necropsia de los animales. Sin embargo, no se analizaron estos resultados debido a la falta de datos de los grupos 1 y 2 en donde se presentaron muertes. La toxicidad sub-aguda, se realizó según la guía (No. 185, Food and Drug Administration, FDA) y la guía No. 407 (OECD). Para esta prueba nos basamos en las dosis de la toxicidad aguda ya que la dosis más alta es 10 veces la dosis recomendada, la cual es de 4mg/kg. Para ello se utilizaron 24 hembras y 24 machos ratas wistar Hsd Han, se dividieron en cuatro grupos de hembras y cuatro grupos de machos de seis animales cada uno. Estos fueron administrados por vía intramuscular con 8 mg/kg (Grupo 1), 24 mg/kg

(Grupo 2) y 40 mg/kg (Grupo 3) mg/kg del compuesto alfa inyectable. Se realizaron análisis de hemograma, bioquímica y necropsia de todos los animales. No se encontraron cambios significativos en los estudios que se realizaron. La citotoxicidad se realizó con las líneas celulares ACT-15, PC-3, Hela y MCF-7, de los cuales 9 correspondían a las siguientes concentraciones del fármaco: 2000, 1500, 1000, 500, 100, 10, 1, 0.1, 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1 testigo (medio de cultivo). Posteriormente se realizó la lectura con sulforrodamida y se hizo la lectura en una en un lector de Elisa. Se observó que hubo una inhibición de crecimiento de células en la concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La prueba de het-cam se utilizó para observar el potencial efecto irritante, en esta prueba se ocupó embrión de pollo de 9 días y se administró 0.3 ml de una dilución de 100 mg/mL esto se realizó por triplicado, no se observó hemorragia, lisis y/o coagulación. Se concluye que, el compuesto alfa inyectable administrado por vía intramuscular a ratas Hsd Han: Wistar, no produjo cambios importantes en los análisis bioquímicos del suero, la hematología y la estructura histomorfológica en la toxicidad subaguda, al compararlo con los datos reportados en la literatura. La información obtenida indica que el compuesto tiene un amplio margen de seguridad.

ABSTRACT

ABEL ZAPATA ARENAS In vivo and in vitro toxicological studies of an injectable fasciolicide.

The objective was to evaluate the toxicity of the injectable alpha compound by means of acute and subacute toxicological studies, cytotoxicity and the het cam test. For acute toxicity, OECD guideline No. 423 was used, where 18 female wistar Hsd Han rats were administered 2000 mg/kg (Group 1), 1000 mg/kg (Group 2), 500 mg/kg (Group 3), 100 mg/kg (Group 4), 10 mg/kg (Group 5) and injectable water (Group 6). Once inoculated, the animals were carefully checked the first 4 hours after 24 hr and every day thereafter for 14 days for hemogram, blood chemistry and necropsy analysis of the animals. However, these results were not analyzed due to the lack of data from groups 1 and 2 where deaths occurred. Sub-acute toxicity was performed according to the guide (No. 185, Food and Drug Administration, FDA) and guide No. 407 (OECD). For this test we based on the doses of acute toxicity since the highest dose is 10 times the recommended dose, which is 4mg/kg. For this purpose, 24 female and 24 male Hsd Han wistar rats were divided into four groups of females and four groups of males of six animals each. These were administered intramuscularly with 8 mg/kg (Group 1), 24 mg/kg (Group 2) and 40 mg/kg (Group 3) mg/kg of the injectable alpha compound. Hemogram, biochemistry and necropsy analyses were performed on all animals. No significant changes were found in the studies performed. Cytotoxicity was performed with ACT-15, PC-3, Hela and MCF-7 cell lines, of which 9 corresponded to the following drug concentrations: 2000, 1500, 1000, 500, 100, 10, 1, 0.1, 0.01 µg/ mL and 1 control (culture medium). Subsequently, the reading was performed with sulforhodamide and the reading was done in an Elisa

reader. It was observed that there was an inhibition of cell growth at the concentration of 500 µg/ mL. The het-cam test was used to observe the potential irritant effect, in this test 9-day-old chicken embryo was used and 0.3 ml of a 100 mg/mL dilution was administered in triplicate, no hemorrhage, lysis and/or coagulation was observed. It is concluded that, the injectable alpha compound administered intramuscularly to Hsd Han: Wistar rats, did not produce significant changes in serum biochemical analysis, hematology and histomorphological structure in subacute toxicity, when compared to data reported in the literature. The information obtained indicates that the compound has a wide margin of safety.

INTRODUCCIÓN

La fasciolosis es una enfermedad ocasionada por el trematodo *Fasciola hepatica*. Esta parasitosis se encuentra distribuida en casi todo el mundo y produce pérdidas económicas debido a que ocasiona muertes y baja producción en ganado bovino, ovino y caprino principalmente, aunque puede llegar a afectar a otras especies como caballos, conejos y cerdos¹. Estas pérdidas económicas incluyen también los gastos que se generan por los tratamientos para esta enfermedad, así como el tratamiento de enfermedades secundarias en el ganado.² A nivel mundial, se gastan alrededor de 3 billones de dólares por año para atender las consecuencias de esta parasitosis³. Es importante mencionar que, esta enfermedad también es considerada como una zoonosis, ya que se han reportado casos en muchos países y en México, específicamente en el estado de Puebla⁴.

1.1 Morfología

Fasciola hepatica es un trematodo que tiene medidas de 18 a 50 mm de largo por 4 a 14 mm de ancho, tiene forma de hoja aplanada dorsoventralmente, la cual tiene forma foliácea, su cuerpo está cubierto por pequeñas espinas, su parte anterior es más ancha que la parte posterior y en la parte anterior presenta una proyección cónica seguida de un par de hombros anchos⁵. En fresco presenta un color pardo grisáceo, su ventosa oral se encuentra en el extremo anterior y a la ventosa ventral se encuentra a la altura de los hombros, su boca está localizada cerca de la ventosa oral, continua con la faringe muscular y el esófago que van directamente al intestino; ésta bifurca a poca distancia de la ventosa oral, una vez dividida se forma ramas primarias y secundarias que atraviesan todo su cuerpo hasta la parte posterior⁶. Debido a que es un parásito

hermafrodita, su sistema reproductor se conforma por los testículos que se encuentran ramificados y se encuentran extendidos hasta la parte posterior de su cuerpo, por otra parte, los ovarios también son ramificados y su poro genital se encuentra debajo de la ventosa ventral. Las glándulas vitelógenas se encuentran ocupando los márgenes laterales. Sus huevos llegan a medir de 130 a 150 por 63 a 90 micras; estos poseen un opérculo en uno de sus extremos, su cáscara es relativamente delgada, tiene un color amarillento en su interior por los pigmentos y no presentan embrión cuando son eliminados ^{6,7}.

1.2 Ciclo biológico

El ciclo biológico de este parásito comienza con la eliminación de los huevos, los cuales pasan al duodeno junto con la bilis, los cuales son eliminados del huésped en las heces. Los huevos se desarrollan en un medio favorable, el cual debe constar de un medio hídrico, como pueden ser charcos, potreros inundados, pequeños ríos de curso lento etc. Para que se puedan desarrollar además del medio hídrico, se requiere una temperatura de 26°C aproximadamente. Con estas condiciones, los huevos eclosionan en alrededor de 9 a 10 días; sin embargo, a temperaturas de alrededor de 10°C, estos no se desarrollan. Cuando los huevos no cuentan con condiciones favorables pueden permanecer viables por un largo periodo y en cuando las condiciones son adecuadas, estos pueden continuar con su desarrollo. Los miracidios de *F. hepática* desarrollados que aún se encuentran en el huevo están formados por glándulas, un espolón cefálico, una mancha ocular en forma de X y su cuerpo presenta cilios. Los miracidios que eclosionan o salen del huevo buscan inmediatamente a un huésped intermediario

(caracoles del género *Lymnaea*) para continuar con su desarrollo, debido a que los miracidios no puede vivir en vida libre o a temperaturas bajas más de 24 horas, una vez eclosionados. La mancha ocular que poseen tiene acción fototrópica, lo cual hace que el miracidio sea atraído hacia la superficie del agua y sean capaces de nadar hasta encontrar a su huésped intermediario, los caracoles del género *Lymnaea*. En México se pueden encontrar las especies *L. bulimoides*, *L. cubensis*, *L. humilis*, principalmente⁷. En Centroamérica y Sudamérica se encuentran las especies *L. viator* y *L. columella*, entre otros⁸. Los miracidios infectan al caracol por la cavidad respiratoria o utilizando su botón cefálico, penetrando el tegumento del pie. Una vez que el miracidio entro en el caracol, éste pierde su cubierta y se transforma en un esporoquiste, de esta pared se forman de 5 a 10 masas germinativas, que se convertirán en redias. El esporoquiste continuará creciendo en las glándulas intestinales del caracol y en su pared corporal, las redias darán paso a más de 50 masas germinativas que darán lugar a otro estadio del parásito, las cercarías. Mientras las condiciones de temperatura y alimentación de los caracoles sean favorables, se puede dar origen a una segunda generación de redias. Después de 6 a 8 semanas, las redias se desarrollan para convertirse en cercarías, las cuales abandonan a las redias a través de su abertura tocológica y al caracol por el aparato respiratorio. Las cercarías llegan a tener un tamaño de 260 a 320 por 200 a 240 micras, esto sin tomar en cuenta que la cola propulsora que es de 500 micras. Por lo tanto, por cada miracidio que entra o infecta al caracol, éste puede dar origen de 400 a 1000 cercarias⁸. Estas cercarias que son liberadas deben nadar activamente, para que poco tiempo después puedan perder su cola propulsora y redondeen su cuerpo; y este cuerpo sea capaz de enquistarse y adherirse a la superficie de las plantas para

transformarse en metacercarias, siendo estas metacercarias la fase infectante de este trematodo. La infección en el huésped definitivo se realiza cuando las metacercarias son ingeridas en el alimento, principalmente a través de pastizales contaminados. Una vez que son ingeridas pasan al intestino, donde se disuelve la membrana quística externa exponiendo al trematodo joven en donde puede llegar a medir hasta 250 micras, durante su recorrido desde el intestino al hígado, éste pasará por la cavidad peritoneal en el transcurso de 2 a 28 horas, luego perforará al hígado por la cápsula de Glisson, y una vez ahí tardará de 4 a 6 días en llegar al tejido hepático, en este último se alojará durante 6 a 8 semanas hasta localizarse en conductos biliares (Figura 1). El parásito tiene una vida en los conductos biliares de ovinos de hasta 11 años y en el caso de los bovinos es de alrededor de 1 año. Las fasciolas jóvenes se nutrirán de sangre y tejido hepático, en cambio, las fasciolas adultas se alimentarán con sangre, bilis y tejido proliferado^{5,6}.

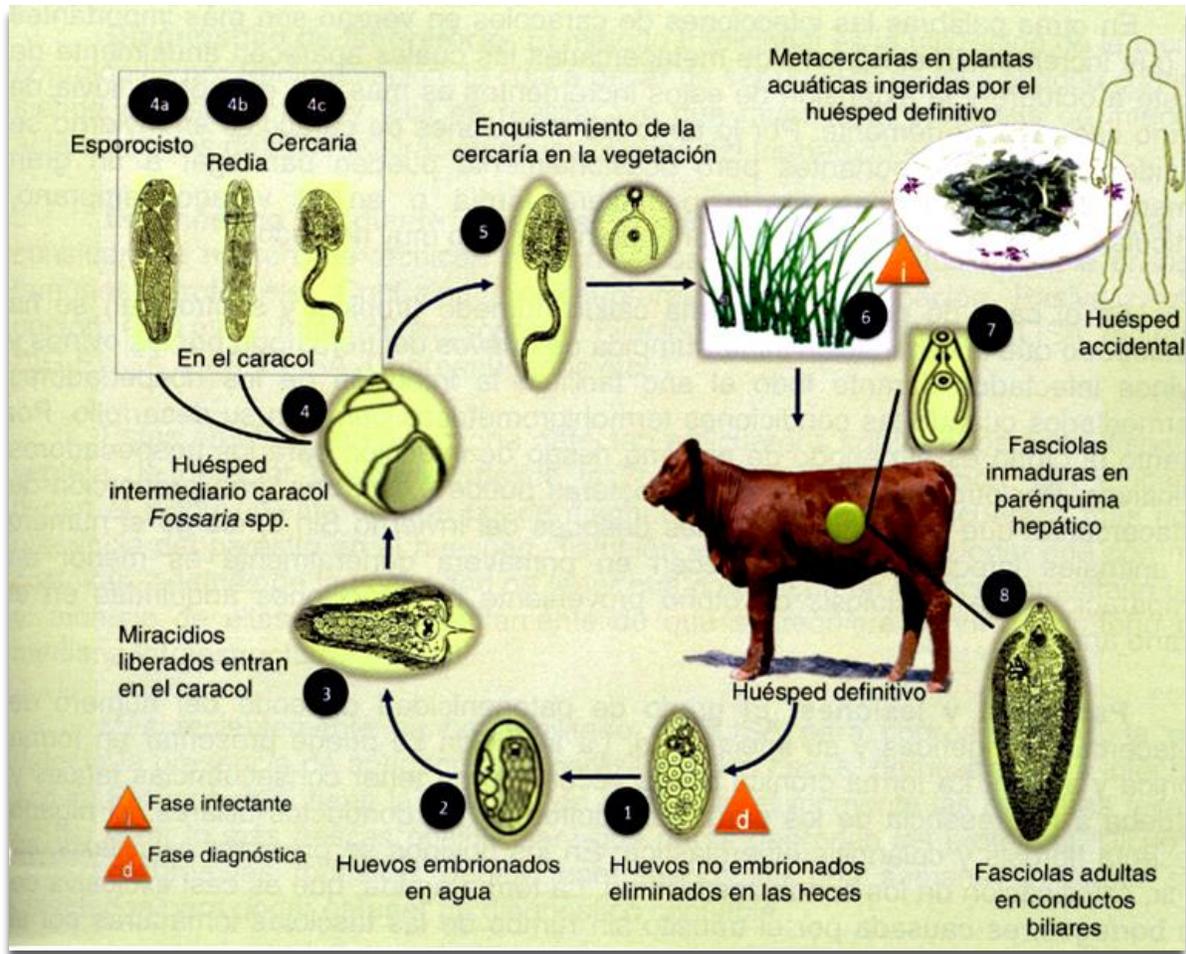


Figura 1. Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*⁷.

1.3 Epidemiología

Esta enfermedad parasitaria se encuentra distribuida ampliamente alrededor del mundo. La fasciolosis en bovinos ha sido reportada en zonas endémicas, por ejemplo, en Chile (94%), en Estados Unidos (California, 52.7%, Florida 68% y Luisiana 25%), Irlanda (45%), España (29.5%), Turquía (29.3%), Perú (29%), Alemania (10.7%), Marruecos (10.4), Camboya (10%) y Nueva Zelanda (8.5%)⁹. Mientras que, en Brasil, la prevalencia va desde 64.8 % hasta un 10.59 % en diferentes partes del país¹⁰. En México, en el

estado de Tlaxcala se observó una frecuencia de 80%, esto con una variación de 100% en Atlangatepec hasta el 6.12% en Tlaxco¹¹. De la misma manera en el estado de Sonora, se reportó en los municipios de Guaymas y Cajeme una prevalencia de $11.4 \pm 0.9\%$, utilizando la técnica de sedimentación y del $24.4 \pm 1.2\%$ con técnicas serológicas como la ELISA en bovinos, $24.5 \pm 1.5\%$ y $43 \pm 1.5\%$ en caprinos y en borregos $19.4 \pm 2.0\%$ y $30.6 \pm 2.7\%$, respectivamente¹². En otro estudio, se reporta una prevalencia en los estados de Veracruz y Puebla del 30.2% y 18.4%, respectivamente¹³. El tratamiento de los animales infectados es indispensable, sin embargo, el surgimiento de parásitos resistentes a los medicamentos no podrá evitar las altas tasas de mortalidad en ovinos y caprinos (Oliveira et al., 2008)¹⁴

1.4 Patología de la enfermedad

Como se describe en el ciclo biológico, una vez que las metacercarias son enquistadas en las plantas, estas son ingeridas por los animales como bovinos, ovinos o caprinos; éstas pasarán del duodeno hacia la cavidad peritoneal viajando hasta el parénquima hepático, penetran el hígado hasta el parénquima hasta llegar a los conductos biliares. Las lesiones provocadas por la fase juvenil son de tipo hemorrágico, infecciones secundarias provocadas por la migración hacia el hígado, así como necrosis del parénquima. Dentro de estas enfermedades secundarias, se encuentra la peritonitis aguda, los abscesos hepáticos, las infecciones por *Clostridium haemolyticum* o *C. novyi* causando necrosis tisular, lo que puede provocar una necrosis en hígado lo que conlleva

a la muerte del animal. Las fasciolas adultas que se encuentran en el los conductos biliares del hígado llegan a provocar colangitis, colangiohepatitis, obstrucción y con ello ectasia y estenosis¹⁵

1.5 Control

El control de esta parasitosis se enfoca en tres estrategias principales, la primera es la utilización de medicamentos químicos que afectan al parásito adulto dentro del huésped definitivo, el segundo es el uso de tratamientos químicos para el control del huésped intermediario (molusquicidas) y el tercero consiste en el manejo de la rotación de los pastizales, evitando así, que los animales se alimenten de potreros que estén infestados de cercarias, así como, evitar el encharcamiento de estos o que se encuentren en ríos de baja movilidad.

Es importante mencionar que, por lo general se opta por la aplicación de agentes químicos dentro del huésped definitivo para atacar al parásito en su fase adulta. Con este antecedente, la Industria Farmacéutica ha desarrollado diversos fasciolicidas, dentro de los cuales se encuentran: los fenoles halogenados (hexaclorofenol, bitionol, niclofolan y nitroxinil), las salicilanilidas (oxiclozanida, brotiana, rafoxanida y closantel), los benzimidazoles o probencimidazoles (albendazol, mebendazol, netobimina y triclabendazol), las sulfonamidas (clorsulón) y los fenoxialcanos (diamfenetidina). Se menciona con base en esta lista que en México los más utilizados son el nitroxinil, closantel, rafoxanida, albendazol y el triclabendazol⁶.

Dentro de estos, los fenoles halogenados como el nitroxinil actúa contra fasciolas adultas pero no en fases juveniles, actúan inhibiendo la fosforilación oxidativa, bloqueando las contracciones musculares paralizando al parásito provocando su muerte al ser administrado por vía gastrointestinal su absorción es pobre, por esta razón debe de ser administrado por vía intramuscular (I.M) o vía subcutánea (S.C)¹⁶. Otro grupo de fármacos son las salicilanilidas el cual contempla a el closantel y la rafoxanida. Este fármaco afecta a fasciolas adultas erosionando el tegumento, bloqueando rutas metabólicas causando la muerte entre 1 a 2 días y las fasciolas que sobreviven pierden la capacidad de reproducirse y de crecimiento. Sin embargo, puede llegar a tener signos de toxicidad cuando se administra 5 veces la dosis recomendada. La rafoxanida tiene un efecto interfiriendo la formación de energía como el ATP, ADP y nucleótidos, afecta el transporte activo de oxígeno a través de la membrana, su vía de administración puede ser gastrointestinal y subcutánea. Una vez que los parásitos mueren pueden encontrarse en la vesícula biliar o en el intestino del huésped debido ya que estos se desprenden⁸. Dentro de los derivados benzimidazólicos, el albendazol fue el más exitoso debido a que posee tener un amplio espectro y con una alta eficacia contra nematodos gastrointestinales, vermes pulmonares y *Fasciola hepatica*, en las Fasciolas actúa desde la semana 9 a 10, con una eficacia del 50 al 70 % en Fasciolas de 11-14 semanas una eficacia del 80 al 90 %¹⁶. Otro derivado es el triclabendazol lanzado a su venta en 1983, siendo el más reciente y eficaz contra *F. hepatica*, su acción es en las fases inmaduras dentro del parénquima hepático y en los conductos contra las fases adultas.¹⁷. Su actividad es interferir con la enzima fumarato reductasa y las funciones microtubulares,

disminuye la maduración del parásito y provoca una muerte lenta. Tiene una biotransformación en el hígado teniendo un metabolito principal llamado sulfóxido, este compuesto es el responsable de tener la actividad fasciolicida. Su absorción por vía oral es buena y es eliminada en un 95 % en heces un 2% en orina y del 1 % en leche ⁸. Su dosis es de 10 mg/kg vía oral para ovinos y de 12 mg en bovinos. Tiene un margen de seguridad amplio, ya que este puede ser administrado hasta 200 mg/kg, a esta dosis los animales pueden presentar incoordinación por 3 días ¹⁸. En el siguiente cuadro (Cuadro 1) se muestra el porcentaje de eficacia de algunos fasciolicidas en ovinos⁷.

Cuadro 1 PORCENTAJE DE EFICACIA DE ALGUNOS FASCIOLICIDAS EN OVINOS																
FARMACO	DOSIS EN mg/Kg	EDAD DE FASCIOLAS EN SEMANAS														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
TRICLABENDAZOL	10	90-95%			99-100 %											
RAFOXANIDE	7.5							91-99 %								
CLOSANTEL	7.5							80-95%			91-99%					
NITROXINIL	10								85%		91-99%					
ALBENDAZOL	7.5									50-70%		80-90%				

Cuadro tomado del libro. Parasitología Veterinaria. Volumen 2. Helmintos VERA M. Y. et al.

Cabe mencionar que el sobreuso y la subdosificación de estos fármacos han generado problemas de resistencia ^{19,20}. Por ejemplo Moll y col. (2000) reportaron la muerte de borregos causada por una enfermedad hepática subaguda y crónica por tratamientos

con triclabendazol para el control de *Fasciola hepatica* que presentó resistencia a triclabendazol esto al norte de Holanda. Esta resistencia al triclabendazol, fue evaluada en un estudio donde se demostró por medio de la cuenta de huevos del parásito, en donde se obtuvo una eficacia del 99.7% en borregos, 4.3% en vacas lecheras y un 36.6% en vaquillas, en donde se observó que la presencia de resistencia al triclabendazol ²¹. Una vez que se ha de mostrado la existencia de resistencia a fasciolicidas, se debe de realizar estudios toxicológicos y de eficacia de nuevos fármacos para contar con nuevas opciones en contra de esta parasitosis.

Dentro de estos nuevos compuestos, se encuentra el compuesto Alfa o 5-Cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol), el cual ha demostrado una alta eficacia en ovinos ^{11, 25, 26, 27, 28}, con su nueva formulación inyectable (fosfato disódico de 5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol). Es importante aclarar que estas actividades de síntesis se realizaron en colaboración interdisciplinaria e institucional con el grupo del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM.

Como se ha mencionado, el control de esta parasitosis se maneja con la aplicación de fasciolicidas en el huésped definitivo. El albendazol es uno de los fármacos más utilizados en el mercado, ya que cuenta con un amplio espectro de acción contra los trematodos, pero su actividad es restringida contra las formas maduras de *F. hepatica*, ya que requiere de dosis altas para mejorar su efectividad.²². También dentro de los fármacos más utilizados se encuentra el triclabendazol, el cual ha mostrado una eficacia elevada contra las fasciolas adultas y juveniles²³; sin embargo, el aumento de la resistencia farmacológica por parte de este parásito, ha hecho que la eficacia de algunos

fármacos como el triclabendazol (TCBZ), el closantel y el clorsulón administrados en ovinos y bovinos contra formas inmaduras y adultas de este trematodo haya disminuido^{24,25}. Además, tomando en cuenta que desde los años 80, cuando se lanzó al mercado el triclabendazol, no se ha producido ningún fármaco de amplio espectro de acción que actúe contra este parásito, se manifiesta necesario desarrollar nuevos fármacos con actividad fasciolicida.

Por otro lado, es pertinente señalar que la industria farmacéutica, ha desarrollado algunos compuestos fasciolicidas, pero éstos son importados, caros y en ocasiones de difícil adquisición. En los años 90's se probó el compuesto Fasciolinip-1 (2-amino-5(6)-cloro-1-metoxycarbonilbenzimidazol), el cual demostró que eliminaba un número limitado de fasciolas de 8 semanas de edad y tuvo un 90.6 % de efectividad en fasciolas de 12 semanas de edad en ovinos ²⁶. Posteriormente, se sintetizó y se probó el compuesto alfa 5-Cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol), el cual demostró tener una eficacia alta contra *F. hepatica* en su forma inmadura y madura en infecciones naturales o artificiales, tanto en ovinos o bovinos, similar a la reportada para el TCBZ ^{27,28,29}. Cabe mencionar que, como otros benzimidazoles, el compuesto alfa es poco soluble en disolventes acuosos, lo cual es el mayor reto para su administración por vía intramuscular ³⁰. En estos últimos años, se sintetizó el compuesto alfa hidrosoluble, al cual se le adicionó el grupo químico fosfonooximetilo, esto con la finalidad de aumentar su solubilidad (13 mg/ml a pH=7) y su disponibilidad por hidrólisis *in vivo*, ya que el grupo de las fosfatasa alcalinas se encuentran en diferentes tejidos, favoreciendo la administración parenteral a dosis bajas. Este nuevo compuesto hidrosoluble (sal disódica) mostró una eficacia del 87.8 % en parásitos adultos en ovejas infectadas

artificialmente con el parásito, utilizando una dosis intramuscular menor a 4 mg/kg en comparación con la dosis reportada para el compuesto alfa original, que obtuvo una eficacia del 86.9 % a una dosis de 15 mg/kg por vía oral ¹⁵. Recientemente, se ha sintetizado un nuevo profármaco hidrosoluble del TCBZ. Este profármaco fue 88,000 veces más soluble que el TCBZ y presentó una eficacia cercana al 100% en ovejas infectadas artificialmente con una dosis intramuscular de 8 mg/kg³². Sin embargo, para su uso clínico en animales es necesario realizar estudios de toxicidad para determinar la seguridad de estos nuevos profármacos.

Para ello, es necesario determinar la toxicidad aguda mediante la administración del fármaco a diferentes dosis, con la finalidad de determinar la dosis letal (DL50); esto considerando que la dosis máxima a probar es de 2000 mg/kg. Importa señalar que, si con esta dosis no se presentan muertes, se puede asegurar que el fármaco probado no es tóxico. Sin embargo, si se llegaran a presentar muertes en los grupos tratados se podría realizar un nuevo experimento donde se utilizan nuevas dosis incluyendo los grupos donde hubo muertes para tener una dosis letal 50 más exacta, esto en seguimiento a la guía 423 Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) .

La toxicidad subaguda se basa en la determinación de la toxicidad tras una única administración repetida del fármaco. Esta prueba considera los siguientes parámetros: mortalidad, signos de toxicidad, patología histopatológica y el cambio de peso de acuerdo con las directrices de prueba de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), es decir, la directriz 407 de la OCDE para la prueba de toxicidad subaguda. Por otro lado, se realizó la prueba de citotoxicidad, esto para obtener datos

de manera más rápido ya que con la necesidad e interés se utilizan metodologías alternativas *in vitro* que relativamente son económicas, rápidas y sencillas, las cuales a su vez contribuyen en la disminución en la utilidad de animales de laboratorio. Tomando en cuenta la disminución del uso de los animales, se pudo realizar la técnica de Het Cam, la cual nos ayuda a la obtención de datos de irritabilidad. Esta prueba esta englobada en las pruebas *in vitro* ya que se utiliza embriones de pollo. Sin embargo, en México no se han analizado estudios de toxicidad *in vivo* de estos nuevos compuestos fasciolicidas. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la toxicidad subaguda del profármaco hidrosoluble del compuesto alfa inyectable en ratas de experimentación, para evaluar la seguridad de este compuesto fasciolicida.

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1- Fármaco

El profármaco hidrosoluble fosfonooximetil del compuesto alfa inyectable, se sintetizó en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México de acuerdo con la metodología reportada por Flores-Ramos et al. (2014).

2.2. Toxicidad Aguda

2.2.1 Animales de laboratorio

Para el estudio de toxicidad aguda, se utilizaron ratas hembra Hsd Han: WIST de 8 a 10 semanas de edad, obtenidas de la empresa proveedora de animales de laboratorio ENVIGO-México (USA). Al momento de su llegada, las ratas fueron identificadas por medio de la aplicación de muescas en las orejas Posteriormente, fueron alojadas en cajas de polisulfonato con las siguientes dimensiones: 26.03 x 47.62 x 20 32 cm y utilizando cama de aserrín de pino. Las condiciones ambientales a las que fueron expuestas dentro de los cuartos fueron de una temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa del 40 al 60% y ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas en la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA) de la Facultad de Química, Conjunto E de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999 de Especificaciones

Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Los animales fueron alimentados con alimento Harlan Teklad 2018S para ratón/rata y con agua *ad libitum* de filtro del módulo de sanitización automática durante todo el estudio. Antes del inicio de la administración, las ratas fueron aclimatadas durante 5 días, durante este periodo se observó y se registró el estado de salud de cada animal y fueron aleatorizadas para cada grupo experimental. Los protocolos experimentales con animales de laboratorio fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química de la UNAM.

La prueba de toxicidad aguda se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones referidas en la Guía de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE, No. 423), la cual señala para este tipo de estudio, la utilización de una serie de dosis del fármaco superior a la recomendada y con una dosis máxima de 2,000 mg/kg de peso corporal y posteriormente, se recomienda disminuirla. Cabe mencionar que la dosis recomendada de este fasciolicida inyectable es de 4 mg/kg de peso corporal en rumiantes ³¹, Por lo que, se prosiguió a utilizar una serie de dosis altas de este compuesto inyectable. Dentro de los seis grupos experimentales, cada grupo estuvo conformado por tres ratas nulíparas no preñadas; siendo las siguientes dosis utilizadas para el compuesto alfa: Grupo 1 (2000 mg/kg), Grupo 2 (1000 mg/kg), Grupo 3 (500 mg/kg), Grupo 4 (100 mg/kg), Grupo 5 (10 mg/kg), todas las dosis fueron diluidas con agua estéril. Finalmente, el Grupo 6 (Control), fue administrado solo con agua estéril utilizando en todos los grupos la vía intramuscular. Una vez administrados, los animales fueron observados y monitoreados con mucho detenimiento durante los primeros 30

minutos posteriores a la inoculación, pasado ese tiempo se observaron durante las siguientes 24 horas y cada día posterior a la inoculación hasta cumplir los 14 días del estudio. Los signos que se tomaron en cuenta fueron: 1) el patrón de comportamiento, 2) los signos de toxicidad como: temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo y coma y así como 3) la mortalidad.

2.2.2 Análisis bioquímico del suero y estudio hematológico

Para el estudio bioquímico y hematológico, se realizaron tomas de sangre periférica en los días 0 y 14 post-tratamiento. Se utilizaron capilares de vidrio para la punción en el plexo retroorbital. Todos los procedimientos se realizaron bajo anestesia inhalada utilizando una máquina de anestesia (VET EQUIP IMPAC6), la cual requirió de isoflurano al 5%. Cada muestra fue depositada y dividida en dos tubos microtainer; una parte fue colocada en un tubo con anticoagulante (EDTA) y la otra en un tubo sin anticoagulante, obteniéndose un volumen de 600 µl de sangre en total para los estudios de bioquímica y hematológico. Los analitos bioquímicos que se midieron fueron: La glucosa, el nitrógeno ureico en sangre (BUN), la creatinina, el colesterol total, los triglicéridos, la alanina aminotransferasa (ALT), el aspartato aminotransferasa (AST), la fosfatasa alcalina, las proteínas totales, la urea y la bilirrubina total. Los parámetros hematológicos medibles fueron el hematocrito (HCT), la hemoglobina (HGB), el recuento de eritrocitos (RBC), el volumen corpuscular medio (MCV), la concentración media de hemoglobina corpuscular (MCHC), el recuento de plaquetas (PLT) recuento de leucocitos (LE), neutrófilos (NE), linfocitos (LY), monocitos (MO) y eosinófilos (EO). Todos los parámetros se midieron

utilizando un analizador bioquímico automatizado (CS-T240, modelo DIRUI) y un analizador hematológico (S. MBC VET, modelo KONTR0 Lab).

2.2.3 Análisis patológico

Para el análisis patológico e histopatológico, se realizó la eutanasia de los animales exponiéndolos a dióxido de carbono (CO₂) dentro de una cámara de eutanasia. Para corroborar la muerte de los animales, se verificó la ausencia de signos vitales como: la respiración, el ritmo cardiaco; así como la falta del reflejo palpebral y la relajación del esfínter anal. Una vez verificada la ausencia de signos vitales, se verificó la ausencia o presencia de cambios en los sitios de inoculación del fármaco alfa inyectable. Posteriormente, se prosiguió con la recolección de los siguientes órganos: cerebro, corazón, pulmón, hígado, bazo, riñón y glándulas suprarrenales de cada rata, con la finalidad de procesarlas con la técnica de parafina para su análisis. Cada muestra de tejido fue colocada en una solución fijadora (formol bufferado al 10%) durante 24 horas. Después las muestras fueron depositadas en un histoquinette (Leica modelo TP 1020) para su procesamiento de deshidratación, aclaramiento e impregnación de parafina. Una vez que, terminó el proceso, los tejidos fueron incluidos en parafina mediante un incluidor de parafina con placa fría (Leica EG 1150 H y EG 1150 C). Se retiró la parafina excedente y se realizaron cortes de 4 a 6 µm en un microtomo (Leica RM 2125 RTS), estos cortes fueron extendidos en un baño de flotación (Marca Leica) y colectados utilizando portaobjetos de vidrio, los cuales se dejaron secar a temperatura ambiente, para finalmente ser teñidos con hematoxilina y eosina (H y E).

2.3. Toxicidad subaguda

2.3.1 Animales de laboratorio

En los estudios de toxicidad subaguda, se utilizaron ratas hembras y machos Hsd Han: WIST (8-10 semanas de edad), obtenidas en ENVIGO-México (USA). Las ratas fueron identificadas por medio de muescas en las orejas y se alojaron en cajas de polisulfonato de 26.03 x 47.62 x 20 32 cm con cama de aserrín de pino. Las condiciones de temperatura, humedad relativa y ciclo luz/oscuridad de los cuartos de alojamiento fueron de 22 ± 2 °C, 40 – 60 % y 12/12 h en la Unidad de Investigación Preclínica (UNIPREC) de la Facultad de Química, Conjunto E de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) con base a los lineamientos de la NOM-062-ZOO-1999 de Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Se observaron y se aclimataron las ratas durante 5 días antes de la administración del tratamiento, durante ese periodo de tiempo se monitoreo el estado de salud y fueron aleatorizadas para cada grupo experimental. Se utilizó alimento Harlan Teklad 2018S para ratón/rata y agua del módulo de sanitización para alimentar a las ratas durante todo el estudio. El protocolo experimental de los animales fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química de la UNAM.

La prueba de esta toxicidad subaguda se llevó a cabo durante un periodo de 28 días, conforme a la Guidance for Industry Target Animal Safety for Veterinary Pharmaceutical Products (No. 185, Food and Drug Administration, FDA) y la Guía No. 407 (OECD). Se

formaron cuatro grupos experimentales con seis animales cada grupo. La dosificación del profármaco hidrosoluble se realizó siguiendo las recomendaciones de las guías anteriormente mencionadas, siendo de la siguiente manera: Grupo 1 (8mg/kg), Grupo 2 (24 mg/kg) y Grupo 3 (40 mg/kg) de peso corporal administrados en los días 0, 7 y 14, respectivamente. El grupo 4 fungió como grupo control, el cual fue inoculado con agua estéril. Los animales fueron monitoreados para observar los parámetros de bienestar con detenimiento durante los primeros 30 minutos, 4 horas, 24 horas después de cada inoculación y luego, diariamente durante los 28 días del estudio. En esta prueba, se midieron y se registraron los datos del peso corporal, la ingesta de alimento, consumo de agua y la mortalidad hasta los 28 días en los grupos de hembras y machos para su análisis.

2.3.2 Análisis bioquímico del suero y estudio hematológico

Se realizó la toma de sangre para esta prueba en los días 0, 14 y 28 días post tratamiento. Se obtuvieron aproximadamente 600 µL de sangre periférica de cada animal, la cual se obtuvo de la misma manera que en la prueba de toxicidad aguda utilizando capilares de vidrio para la punción del plexo retroorbital, bajo anestesia con isoflurano (5 %) en una máquina de anestesia (VET EQUIP IMPAC6). Estas muestras fueron depositadas en tubos microtainer con anticoagulante y sin anticoagulante. Se midieron los mismos analitos: hematocrito (HCT), la hemoglobina (HGB), el recuento de eritrocitos (RBC), el volumen corpuscular medio (MCV), la concentración media de hemoglobina corpuscular (MCHC), el recuento de plaquetas (PLT) recuento de leucocitos (LE), neutrófilos (NE), linfocitos (LY), monocitos (MO) y eosinófilos (EO), en un analizador bioquímico

automatizado (CS-T240, modelo DIRUI) y un analizador hematológico (S. MBC VET, modelo KONTRO Lab).

2.3.3 Análisis patológico

La eutanasia, necropsia, recolección y la conservación de los órganos de los animales para este estudio, se realizó como se mencionó anteriormente en la prueba de toxicidad aguda. Los tejidos fueron fijados y procesados por la técnica de parafina y teñidos con hematoxilina y eosina (H y E), como ya se ha descrito.

2.4 – Citotoxicidad

La prueba de citotoxicidad se realizó utilizando cuatro líneas celulares HELA, MCF7, PC3 y HCT 15, las cuales fueron teñidas con sulforodamina para evaluar la concentración inhibitoria. El procedimiento para estas células fue el siguiente: Se descongelaron las células en baño María a 37°C, dentro de la campana de flujo laminar, se lavaron estas células con medio de cultivo EMEM para las líneas Hela y MCF-7, Hct-15 con RPMI-1640 y Pc3 con F-12K para eliminar la mayor cantidad de DMSO con el que fueron congeladas y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, se decantó el sobrenadante para obtener el botón de células, el cual se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo correspondiente a cada línea celular. Se analizó la viabilidad utilizando el colorante azul tripano, utilizando una cámara de Neubauer y se observó en el microscopio invertido, utilizando la siguiente fórmula se obtuvo el porcentaje de viabilidad:

$$(((\% \text{ de células vivas}) / 2) / 2) \times 10000 = X$$

Una vez contadas las células vivas, se procedió a la siembra de estas células en cajas de cultivo (dimensiones de las cajas). Después de dos confluencias al 80% se agregó 0.5 mL de tripsina y 0.5 mL de PBS para que las células se despegaran y se volvieran sembrar en placas de cultivo de 96 pozos. Se realizaron los cálculos para obtener 20,000 células por pozo y se incubaron a una temperatura 37 °C y un porcentaje de CO₂ del 5 % por 24 horas en una incubadora (modelo y marca), transcurridas estas horas se procedió a retirar el medio de cultivo que tenían y se le colocó medio de cultivo con diferentes concentraciones del fármaco. Se utilizaron 10 pozos de la placa de 96 pozos para cada línea celular; de los cuales 9 pozos correspondieron a las siguientes concentraciones del compuesto hidrosoluble: 2000, 1500, 1000, 500, 100, 10, 1, 0.1, 0.01 µg/ mL y 1 pozo testigo (solo con medio de cultivo). Este ensayo se realizó por triplicado. Después de 24 horas de incubación con las diferentes dosis del fármaco, se detuvo la reacción con ácido tricloro-acético al 10% a 4 °C durante una hora. Posteriormente, se lavó con agua destilada y se dejó secar cada pozo a temperatura ambiente. Finalmente, se agregaron 50 µL de sulforodamina B al 4 % en ácido acético al 1% en cada pozo y se dejó incubar durante 30 minutos, se retiró el exceso de colorante lavándolo 5 veces con ácido acético al 1 % y se dejó secar completamente. Se adicionaron 100 µL de una solución de Tris-base 10 mM (pH= 10.5) y se agitó suavemente por 5 minutos. Se realizó la lectura de las placas en un lector de microplaca a una longitud de onda de 490 - 550 nm. Después de la lectura se obtuvo por medio de la formula la viabilidad celular.

La absorbancia del pozo sin tratamiento es el 100 % y con ese 100 % se van a ir sacando el porcentaje de los demás pozos los cuales con ayuda de una gráfica podemos observar la concentración inhibitoria 50.

Posteriormente, se realizó una aproximación de la concentración inhibitoria utilizando la ecuación de tendencia en Excel.

2.5 – Het Cam

Esta prueba se realizó para observar el grado del potencial irritante en las mucosas por parte del fármaco. Se utilizaron embriones de pollo de 9 días de fertilización los huevos defectuosos son descartados, los cuales fueron mantenidos en una incubadora durante 24 horas a una temperatura de 37 a 38 °C, con una humedad de $55 \pm 7\%$. Los embriones fueron utilizados al día siguiente en donde con ayuda de una lámpara se marca la cámara de aire de cada embrión y con cuidado se retira el cascarón utilizando tijeras y pinzas previamente desinfectadas, se humedece con solución salina fisiológica isotónica al 0.9 % a una temperatura de 37°C la membrana externa la cual se retira con cuidado evitando romper los vasos sanguíneos adyacentes.

El producto de prueba fue preparado con 100 mg en 1 ml de agua inyectable y como control positivo se utilizó la solución de Lauril sulfato de sodio (SDS) al 1% y el PBS como control negativo.

Una vez que se prepararon los productos se añadieron 0.3 ml (300 µl) de la solución control positivo (SDS), del control negativo (PBS) y el producto de prueba, esto sobre la membrana de cada embrión en el caso del producto de prueba se realizó por triplicado.

Ya colocados los productos sobre la membrana corioalantoidea, se tomó el tiempo de 5 minutos para observar los cambios en la membrana en donde se presentarían reacciones como hemorragia, lisis vascular y coagulación. Para cada una de estas reacciones, se anotó el tiempo para después ser sustituido en la siguiente fórmula para obtener el índice de irritación³⁴.

$$IS = \frac{301 - \text{sec. H}}{300} .5 + \frac{301 - \text{sec. L}}{300} .7 + \frac{301 - \text{sec. C}}{300} .9$$

H: Hemorragia

L: Lisis vascular

C: Coagulación

sec: inicios segundos

Una vez obtenido este índice se determina los grados de severidad como:

0= Sin Reacción

1= Reacción leve

2= Reacción moderada

3= Reacción severa

RESULTADOS

3.1- Toxicidad aguda

Durante las revisiones de esta prueba, se observó la muerte de 2 animales en el grupo

1 (2000 mg/kg) y 1 animal muerto en el grupo 2 (1000 mg/kg), ya que estas muertes fueron en el transcurso de la noche al momento de encontrarlos por su descomposición no se pudo realizar la necropsia y conservación de los órganos para su estudio patológico e histopatológico de estos animales sin embargo se realizaron las eutanasias de los animales vivos de los demás grupos a los cuales se les realizó la necropsia y el análisis histopatológico de los órganos recolectados como: el músculo, el cerebro, el corazón, el pulmón, el hígado, el bazo y las glándulas suprarrenales en donde se no se observó cambios histopatológicos en comparación con el grupo control. El tejido renal del grupo tratado no presentó cambios morfológicos en comparación al grupo con agua inyectable ya que mantienen la misma morfología (figura 2). En cuanto al análisis del estudio de la química sanguínea, por la falta de estos datos no se pudo analizar esta información. Sin embargo, como marca la guía de la OCDE, una vez que se presenta alguna muerte se tomará como tóxico el fármaco a esa dosis, por lo que se interpreta que la toxicidad se encontraría alrededor de los 1000 mg/kg de peso.

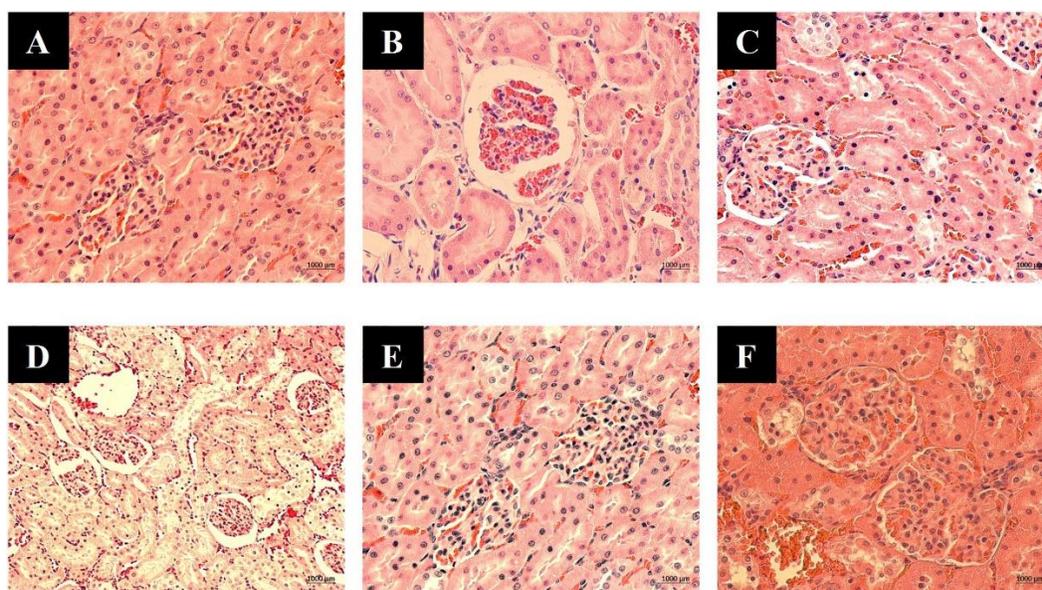


Figura 2: Hallazgo histopatológico en la toxicidad aguda del compuesto alfa inyectable

en el riñón de ratas Hsd Han: WIST inoculadas con 2 000 (A), 1 000 (B), 500 (C), 100 (D) y 10 (E) mg/kg de peso corporal de compuesto alfa inyectable y grupo control (F). Las secciones histológicas se tiñeron con Hematoxilina y Eosina (H & E) observados a 40X.

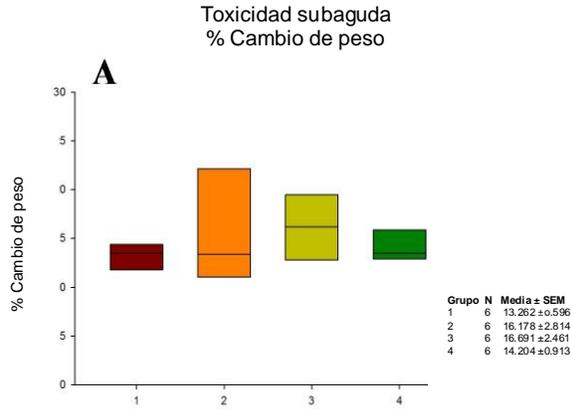
3.2 Toxicidad subaguda

Se observa en la figura 3^a, el cambio de peso corporal en ratas hembras Wistar, en los grupos dosificados con 8 (Grupo 1), 24 (Grupo 2), 40 (Grupo 3) mg/kg de peso corporal del compuesto alfa y agua inyectable (Grupo 4). Aunque se observaron cambios en el porcentaje de peso corporal del Grupo 2 (24 mg/kg), en el análisis no se encontraron diferencias significativas en el peso corporal entre los grupos experimentales (Kruskal-Wallis: Hg.l. = 3; 0,05 = 1,900; p = 0,593; no significativo o n.s). De igual manera las ratas machos (Figura 3-B) el porcentaje en el peso corporal presentó ligeros cambios en los grupos 1 (8 mg/kg) y 2 (24 mg/kg), pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (F = 0,541 P = 0,663 n.s).

En la Fig. 3C y D, se muestra el consumo de alimento en el grupo tratado de hembras (6 ratas por grupo) y en el grupo de machos (6 ratas por grupo) en comparación con el grupo control (6 ratas sin tratamiento). En las ratas hembras, el porcentaje de consumo de alimentos se calculó con la siguiente ecuación [(Peso final de la comida – Peso inicial / Peso inicial) X 100] / 3 o 4 dependiendo de los días de muestreo para todos los grupos. El grupo 4 (agua inyectable) presentó un cambio (Figura 3C) pero no hubo diferencia estadística entre los grupos de tratamiento (Kruskal-Wallis: Hg.l. 3; 0,05 = 7,550; p = 0,056, n.s). Sin embargo, se observó una tendencia similar en el consumo de alimentos entre el 11 y el 12 %. En los machos (Figura 3D), se observó una diferencia

estadísticamente significativa en el grupo 3 (40 mg/kg) en comparación con el grupo 1 (8 mg/kg) (Kruskal-Wallis: Hg.l. = 3; 0,05 = 14,102; $p = 0,003$). Asimismo, se encontraron diferencias significativas entre el grupo 1 (8 mg/kg) (prueba de suma de rangos de Mann-Whitney, $p = 0,017$), el grupo 2 (24 mg/kg) (prueba de suma de rangos de Mann-Whitney, $p = 0,442$) y el grupo 3 (40 mg/kg) (prueba de suma de rangos de Mann-Whitney, $p = 0,065$) en comparación con el grupo control (agua inyectable). Este análisis estadístico indicó que había una diferencia entre el grupo 1 (8 mg/kg) y el grupo 4 (agua inyectable), teniendo en cuenta que el rango de cambio del % de consumo de alimentos en todos los grupos era similar (13 – 14 %)

Hembras



Machos

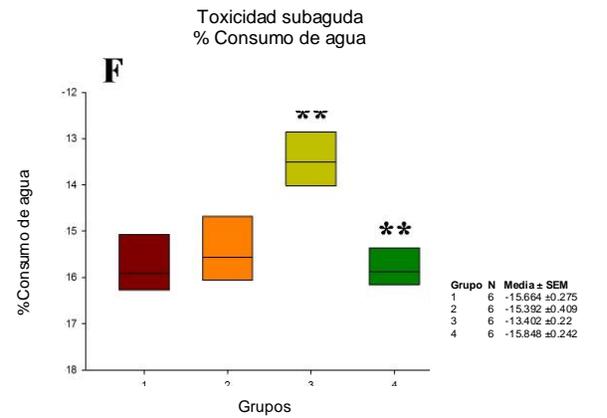
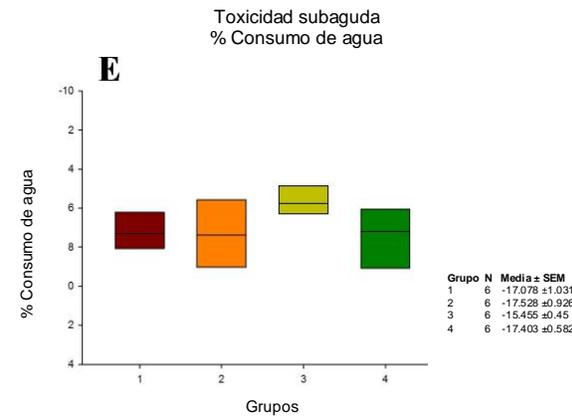
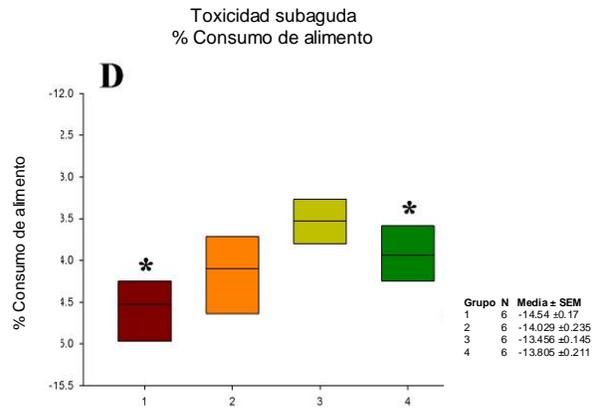
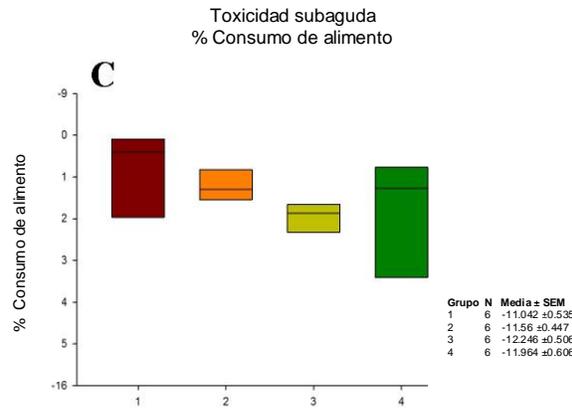
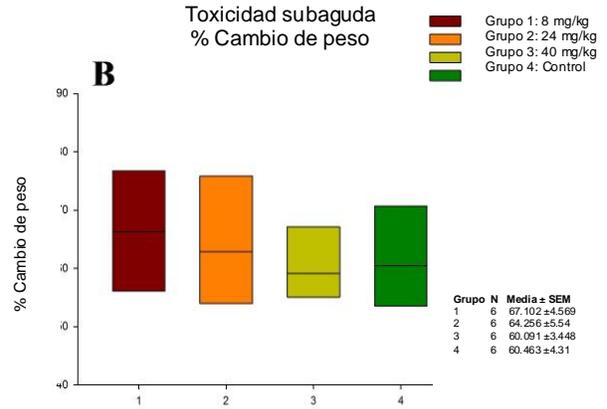


Figura 3. Efecto del compuesto alfa en la toxicidad subaguda de 28 días sobre el % de peso corporal, el consumo de alimentos y la ingesta de agua de ratas hembras y machos Hsd Han: Wistar. * Significación estadística (Kruskal-Wallis: Hg.l. = 3; 0,05 = 14,102; $p = 0,003$); ** diferencias estadísticas entre los grupos 4 y 3 ($p \leq 0,001$).

En cuanto al porcentaje de consumo de agua según la ecuación $[(\text{Medida de agua final} - \text{Medida de agua inicial}) / \text{Medida de agua inicial}] * 100$ / 3 o 4 dependiendo de los días de muestreo. En la Figura 3E, se observa un incremento en el consumo de alimento pero no se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos en las ratas hembras ($p = 0,237$; n.s). No obstante, el consumo de agua fue similar en todos los grupos (15–17 %). Pero se observaron diferencias estadísticamente significativas en las ratas machos (Figura 3F). Utilizando una ANOVA de una vía, se detectó una diferencia entre el grupo 3 (40 mg/kg) y en comparación con los otros grupos ($p < 0,001$). Después se realizó una prueba t para observar diferencias estadísticas entre los grupos 3 (40 mg/kg) y 4 (agua inyectable) ($p \leq 0,001$). En los demás grupos no hubo diferencias significativas teniendo en cuenta que, la ingesta de agua en los grupos 1 (8 mg/kg), 2 (24 mg/kg), 4 (agua inyectable) fue de alrededor del 15 %, mientras que la del grupo 3 (40 mg/kg) tuvo una reducción del 13 %. Por lo tanto, el consumo de agua y comida no afectó al peso corporal en todos los grupos.

No se observaron cambios aparentes en los hallazgos histológicos de los músculos y órganos analizados de los animales tratados y del grupo control. El examen histopatológico del riñón presentó una estructura morfológica normal (Figura 4).

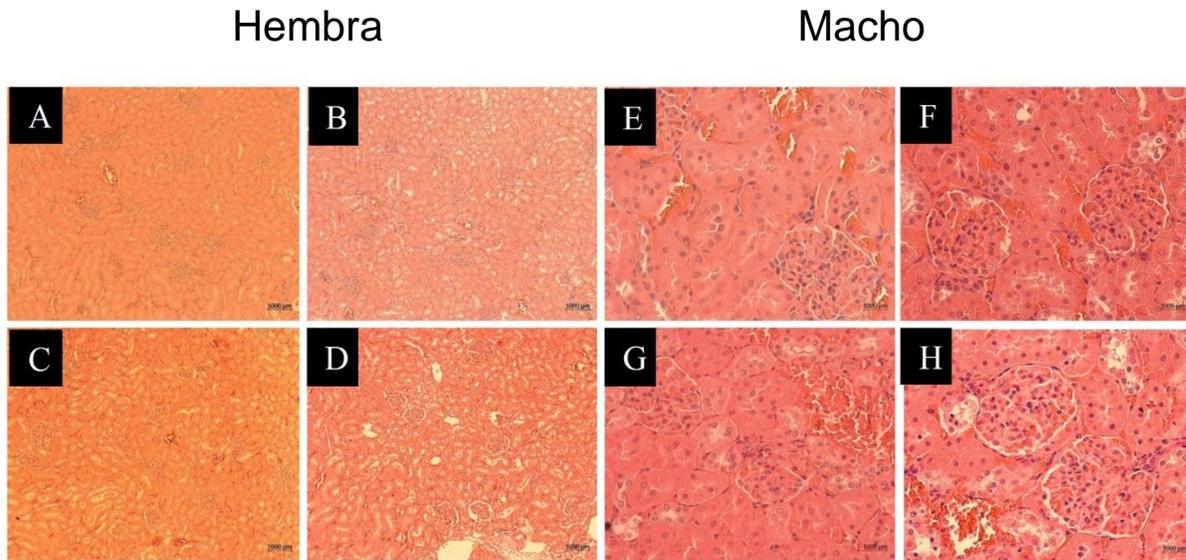


Figura 4. Hallazgo histológico en la toxicidad subaguda en el riñón de ratas hembras (A, B, C y D) y ratas machos (E, F, G y H) Hsd Han: Wistar inoculados con 8 (A, E), 24 (B, F), 40 (C, G) mg/kg por peso corporal del compuesto alfa y grupo control (D, H; agua inyectable). Los cortes histológicos fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina (H & E) observados a 10X y 40X.

El efecto del tratamiento del compuesto alfa sobre los parámetros bioquímicos del suero se observa en el Cuadro 2. Se encontró una diferencia estadística con el analito de glucosa entre los grupos 1 (8 mg/kg), 2 (24 mg/kg) comparados con el grupo 3 (40 mg/kg) usando una ANOVA de una vía ($p = 0.001$) de acuerdo a la siguiente ecuación: $(\text{Resultado final} - \text{Resultado inicial} / \text{Resultado inicial}) \times 100$ en ratas hembras. Para corroborar esta diferencia, la prueba de Tukey mostró una diferencia estadística entre los Grupos 1 (8 mg/kg), 2 (24 mg/kg) y 3 (40 mg/kg) en comparación con el grupo 4 (agua inyectable). Además, el colesterol presentó diferencias significativas en dos grupos (1

inoculado con 8 mg/kg y el grupo control) mediante la prueba de Tukey ($p = 0,022$). En cambio, en el Cuadro 3, no se observó ninguna diferencia estadística en las ratas machos.

Cuadro 2. Resultados de los parámetros bioquímicos del suero en el estudio de toxicidad subaguda en ratas hembra Hsd Han: Wistar.

Parámetros	Hembras			
	Media \pm SEM			
	Grupo 1 (8 mg/kg)	Grupo 2 (24 mg/kg)	Grupo 3 (40 mg/kg)	Grupo 4 (control)
Glucosa (mmol/L)	-25.88 \pm 1.43*	-17.60 \pm 5.41*	-13.19 \pm 7.13*	11.22 \pm 6.78
BUN (mmol/L)	17.72 \pm 7.83	17.36 \pm 9.59	17.30 \pm 6.76	1.36 \pm 4.75
Creatinina (mmol/L)	2.30 \pm 3.77	-0.29 \pm 2.20	2.55 \pm 3.64	-6.70 \pm 4.49
Colesterol (mmol/L)	-9.85 \pm 2.54**	0.68 \pm 3.77	1.55 \pm 4.49	5.92 \pm 1.94
Triglicéridos (mmol/L)	-39.89 \pm 10.34	12.11 \pm 13.32	11.99 \pm 23.69	37.45 \pm 24.85
ALT (U/L)	2.13 \pm 8.05	8.41 \pm 7.51	12.61 \pm 11.13	19.65 \pm 9.81
AST (U/L)	0.80 \pm 7.95	-8.77 \pm 11.82	20.36 \pm 11.67	9.58 \pm 15.23
ALP (U/L)	-15.2 \pm 2.74	-15.63 \pm 4.82	-25.51 \pm 4.68	-4.27 \pm 6.77
Proteínas (mmol/L)	3.47 \pm 1.61	2.89 \pm 3.12	7.59 \pm 2.20	4.70 \pm 2.35
Urea (mmol/L)	20.23 \pm 7.22	18.76 \pm 9.70	16.27 \pm 6.05	1.28 \pm 5.67
Bilirrubinas (mmol/L)	35.97 \pm 25.92	12.31 \pm 14.89	71.15 \pm 30.83	16.11 \pm 12.74

BUN= Nitrógeno ureico en sangre; ALT= Alanina aminotransferasa; AST= Aspartato aminotransferasa; ALP= Fosfatasa alcalina, Grupo tratado con 8 mg/kg (Grupo 1);

24 mg/kg (Grupo 2); 40 mg/kg (Grupo 3) mg/kg por peso corporal; Agua inyectable (Grupo control); * Diferencia estadística por ANOVA de una vía en Glucosa ($p = 0.001$); ** Presenta significancia estadística por ANOVA de una vía en colesterol ($p = 0.022$) en ratas hembras.

Cuadro 3. Resultados de los parámetros bioquímicos del suero en el estudio de toxicidad subaguda en ratas machos Hsd Han: Wistar.

Parámetros	Machos			
	Media \pm SEM			
	Grupo 1 (8 mg/kg)	Grupo 2 (24 mg/kg)	Grupo 3 (40 mg/kg)	Grupo 4 (control)
Glucosa (mmol/L)	-6.48 \pm 3.01	-12.78 \pm 4.88	5.98 \pm 8.70	2.02 \pm 5.75
BUN (mmol/L)	3.99 \pm 3.19	3.7 \pm 2.25	1.32 \pm 2.18	-2.41 \pm 6.36
Creatinina (mmol/L)	7.06 \pm 3.90	4.77 \pm 3.98	6.26 \pm 4.12	6.81 \pm 4.06
Colesterol (mmol/L)	-18.10 \pm 1.99	-16.31 \pm 2.32	-21.46 \pm 1.84	-11.72 \pm 3.76
Triglicéridos (mmol/L)	29.35 \pm 10.35	48.26 \pm 14.84	47.80 \pm 18.93	73.59 \pm 24.83
ALT (U/L)	-2.67 \pm 3.54	-6.80 \pm 4.47	-14.27 \pm 2.27	-8.09 \pm 5.93
AST (U/L)	-17.65 \pm 3.70	-7.75 \pm 10.52	-14.21 \pm 3.82	-10.92 \pm 5.29
ALP (U/L)	-31.80 \pm 1.27	-29.29 \pm 3.21	-37.17 \pm 2.21	-36.09 \pm 2.37
Proteínas (mmol/L)	7.79 \pm 2.49	8.18 \pm 1.94	4.61 \pm 0.61	7.3 \pm 1.03
Urea (mmol/L)	4.16 \pm 4.51	3.85 \pm 2.88	1.31 \pm 1.92	-2.73 \pm 5.63
Bilirrubinas (mmol/L)	13.18 \pm 7.44	11.40 \pm 15.70	23.67 \pm 17.66	15.99 \pm 7.96

BUN= Nitrógeno ureico en sangre; ALT= Alanina aminotransferasa; AST= Aspartato aminotransferasa; ALP= Fosfatasa alcalina, Grupo tratado con 8 mg/kg (Grupo 1); 24 mg/kg (Grupo 2); 40 mg/kg (Grupo 3) por peso corporal; Agua inyectable (Grupo control).

En el cuadro 4, se observan las diferencias estadísticas en los análisis hematológicos de las ratas hembras. Se puede observar los cambios en el hematocrito en las ratas hembras en los grupos tratados con 8 mg/kg (Grupo 1), 24 mg/kg (Grupo 2), 40 mg/kg en comparación con el grupo control, así como el recuento de plaquetas (grupos 24 mg/kg y control) mostrando diferencia estadística por medio de una Anova de una vía ($p = 0,037$) y la prueba de Tukey corroboró esta diferencia ($p = 0,011$), respectivamente.

Cuadro 4. Resultados de los parámetros hematológicos en el estudio de toxicidad subaguda en ratas hembras Hsd Han: WISTAR .

Parámetros	Hembras			
	Media ± SEM			
	Grupo 1 (8 mg/kg)	Grupo 2 (24 mg/kg)	Grupo 3 (40 mg/kg)	Grupo 4 (control)
HCT (L/L)	9.92±1.66*	12.09±3.00*	8.52±0.38*	1.33±1.33
HGB (g/L)	7.38±1.12	5.30±2.09	8.59±1.17	3.89±2.04
RBC x10 ¹² /L)	19.03±5.57	26.74±6.89	24.91±4.50	21.62 ±2.81
MCV (fL)	-6.65±4.23	-10.54±4.59	-12.82±3.08	-13.57±1.28
MCHC (g/L)	-2.49±1.07	6.143±2.28	6.02±6.04	-0.57±1.55
PL (x10 ⁹ /L)	57.47±27.77	75.15±25.65*	-23.46±14.33	-3.40±15.28
LE (x10 ⁹ /L)	-35.18±4.58	-30.14±13.26	-22.34±10.97	-27.68±9.70
NE (x10 ⁹ /L)	9.91±33.59	-36.27±21.75	-19.98±30.04	-14.96±35.14
LY (x10 ⁹ /L)	-37.55±5.82	-29.14±12.53	-20.11±13.03	-25.75±10.07
MO (x10 ⁹ /L)	-11.67±17.97	11.67±4.01	-3.33±19.94	-16.67±16.67
EO (x10 ⁹ /L)	-33.33±21.08	-50.0±22.36	-15.0±17.08	-45±24.73

HCT= Hematocrito; HGB= Hemoglobina; RBC= Conteo de eritrocitos; MCV= Volumen medio corpuscular; MCHC= Concentración media de hemoglobina corpuscular; PL= Conteo de plaquetas; LE= Conteo de leucocitos; NE= Neutrofilos; LY= Linfocitos; MO= Monocitos; EO= Eosinofilos; *Diferencia estadística por una ANOVA de una vía en HCT

($p = 0.037$) y en el conteo de plaquetas ($p = 0.011$) en ratas hembras; ** Presenta significancia estadística por ANOVA de una vía en RBC ($p = 0.02$) and MCV ($p = 0.012$) en ratas hembras.

En el Cuadro 5, se observó que los eritrocitos (RBC) y el MCV presentaron diferencia estadística entre los grupos 1 (8 mg/kg) y 3 (24 mg/kg) en comparación con el grupo control en ratas machos por una Anova de una vía ($p = 0,02$ y $p = 0,012$) y se verificó con la prueba de Tukey.

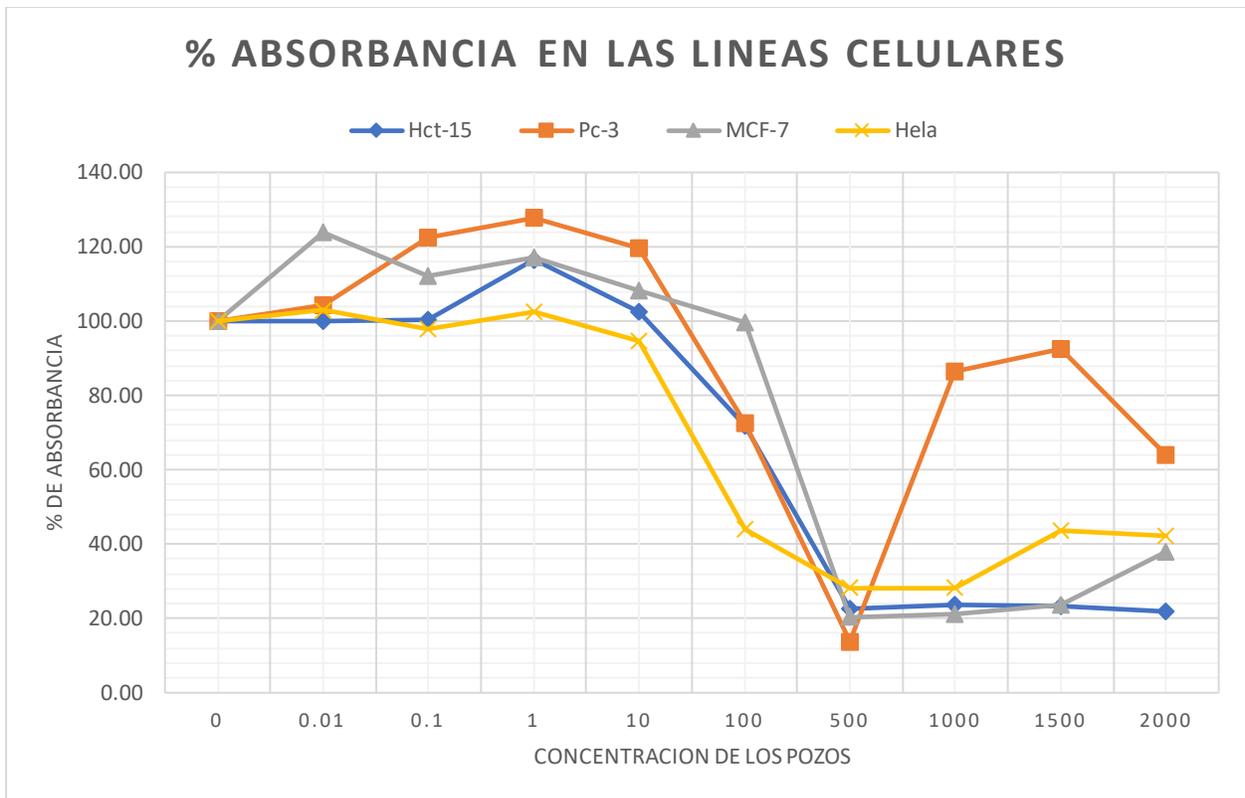
Cuadro 5. Resultados de parámetros hematológicos en el estudio de toxicidad subaguda en ratas machos Hsd Han: WISTAR

Parámetros	Machos			
	Media \pm SEM			
	Grupo 1 (8 mg/kg)	Grupo 2 (24 mg/kg)	Grupo 3 (40 mg/kg)	Grupo 4 (control)
HCT (L/L)	9.43 \pm 1.86	10.64 \pm 1.57	12.38 \pm 3.06	9.90 \pm 1.43
HGB (g/L)	12.01 \pm 1.80	14.64 \pm 1.40	13.95 \pm 1.56	13.34 \pm 1.37
RBC (x10¹²/L)	49.85 \pm 5.71**	40.57 \pm 4.91	50.71 \pm 7.59**	23.61 \pm 6.36
MCV (fL)	-27.07 \pm 2.60**	-20.75 \pm 2.89	-25.41 \pm 2.34**	-9.02 \pm 5.93
MCHC (g/L)	3.19 \pm 2.07	3.93 \pm 1.50	1.84 \pm 1.89	2.94 \pm 1.36
PL (x10⁹/L)	23.53 \pm 35.59	8.35 \pm 11.39	-15.01 \pm 6.34	-2.27 \pm 8.26
LE (x10⁹/L)	-4.53 \pm 17.66	14.62 \pm 20.04	-25.76 \pm 7.20	-25.51 \pm 6.93
NE (x10⁹/L)	14.07 \pm 39.65	51.81 \pm 26.79	-2.88 \pm 29.65	-18.36 \pm 19.01
LY (x10⁹/L)	-0.70 \pm 17.69	18.59 \pm 22.3	-26.44 \pm 6.74	-25.57 \pm 6.79

HCT= Hematocrito; HGB= Hemoglobina; RBC= Conteo de eritrocitos; MCV= Volumen medio corpuscular; MCHC= Concentración media de hemoglobina corpuscular; PL= Conteo de plaquetas; LE= Conteo de leucocitos; NE= Neutrófilos; LY= Linfocitos; MO= Monocitos; EO= Eosinófilos;** Presenta significancia estadística por ANOVA de una vía en RBC (P = 0.0200) and MCV (P = 0.0120) en ratas machos

Citotoxicidad

Los resultados obtenidos en la citotoxicidad mostrados por la absorbancia se observan en la gráfica 1. En esta gráfica se muestra las cuatro líneas celulares que se utilizaron donde se observa una inhibición de crecimiento celular entre las concentraciones de 100 y 500 µg



Grafica 1 Se observa que la concentración inhibitoria se encuentra entre las concentraciones de 100 y 500 μg en todas las líneas celulares.

Utilizando la ecuación de tendencia en Excel se obtuvo la aproximación de la concentración inhibitoria CI_{50} en donde se confirma que la concentración inhibitoria 50 se encuentra entre los 100 y 500 μg . (Cuadro 6).

Cuadro 6: Se observa la concentración inhibitoria en las líneas celulares Hela, Mcf-7, Pc-3 y Hct-15 por medio de la ecuación de tendencia en Excel.

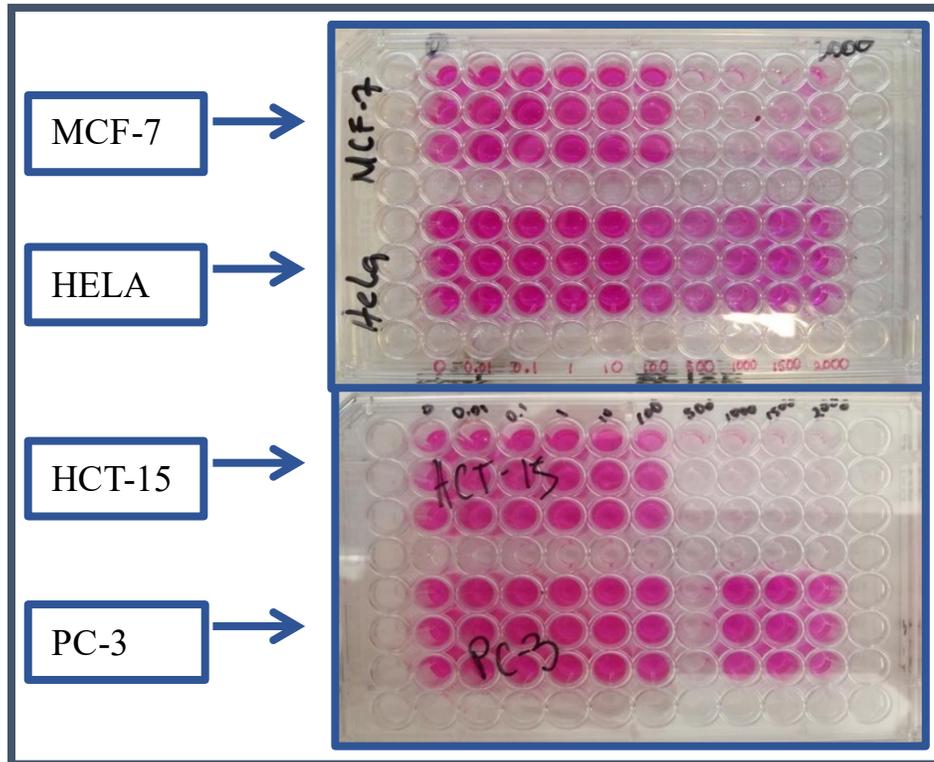
Línea celular	Concentración inhibitoria 50
Hela	118.57
Mcf-7	344.72
Pc-3	255.04
Hct-15	187.38

Se puede realizar la conversión utilizando un borrego de 100 kg y teniendo en cuenta que tiene 6 litros de sangre en donde teniendo una dosis de 4 gr por kilo estaríamos administrando 400mg entre los 6 litros tenemos una concentración de 66 mg por litro y esto indica que tenemos 66 μg en 1 ml lo cual es más bajo que la CI50.

Este efecto se observa también en la figura 5 donde se puede observar la disminución de la tinción de la sulforrodamida en la placa con los diferentes tipos celulares.

Se observó que la concentración inhibitoria se encuentra entre los 100 y 500 μg

Figura 5. se observa la placa con los diferentes tipos de células por triplicado y las concentraciones a las que se les fueron expuestas, así como la inhibición por falta de sulforrodamida entre las concentraciones de 100 y 500 μg .



Het Cam

Después de los 5 minutos transcurridos, no se presentó ningún cambio como hemorragia, lisis o coagulación, por lo que en la clasificación en la que entra estos resultados fue de sin reacción. Esto se puede observar en la figura 6.

Figura 6.- Se observa el producto sobre la membrana corio alantoidea en la cual no se presentó ningún cambio como hemorragia lisis o coagulación.



DISCUSIÓN

En la toxicidad aguda hubo 3 muertes, que se presentaron en los grupos 1 (2000 mg/kg) y 2 (1000 mg/kg), estas se produjeron después de 48 h post-tratamiento, la guía de la OCDE 423 menciona que debido a las muertes presentadas se deberá de realizar experimentos para encontrar la dosis letal, debido a que las muertes se presentaron en las dosis más altas, suponemos que la dosis letal se encuentra dentro de las dosis de 2 000 y 1 000 mg/kg. Para el caso de la toxicidad subaguda, se decidió utilizar la dosis de 40 mg/kg que representa 10 veces la dosis recomendada de 4 mg/kg.

En el caso del estudio hematológico en la prueba de toxicidad subaguda del compuesto alfa inyectable, cuatro de estos parámetros mostraron diferencias estadísticas ($p < 0,01$) en comparación con el grupo control. Sin embargo, de acuerdo a la literatura, estos valores están dentro de los valores normales^{35,36}. Estas variaciones pueden deberse a las variaciones normales que presentan todos los grupos tratados. Por lo tanto, esto sugiere que el compuesto alfa inyectable no mostró ninguna toxicidad en el sistema hematopoyético^{35,36}. Los valores bajos de glucosa y colesterol presentaron diferencia estadística en la prueba bioquímica sérica en las ratas hembras, aun cuando estaban en rangos normales.

Otro estudio presentó valores elevados en estos analitos en comparación con el grupo control, aunque estos valores también se encontraban dentro de los valores normales^{35,36}. En los machos tratados no hubo diferencias en estos analitos.

Con relación al examen histopatológico, las lesiones comunes encontradas en la prueba subaguda son cambios intersticiales, congestión, hemorragias e infiltración de células inflamatorias^{37,38}. Sin embargo, en este estudio de toxicidad aguda, no se observaron

cambios en los órganos (músculo, cerebro, corazón, pulmón, bazo, hígado, riñón y glándulas suprarrenales). No se encontraron cambios en la estructura celular ni en otros mencionados anteriormente, que se relacionaron con el análisis de la bioquímica del suero.

Teniendo en cuenta que la dosis de la citotoxicidad se encuentra por debajo de la Concentración Inhibitoria, se puede suponer que no presenta toxicidad en los animales tratados a dosis de 4 mg por kilogramo.

En cuanto a la prueba de Het Cam, se observó que no presenta ninguna reacción, por lo que el producto es seguro en esta prueba.

Finalmente, el compuesto alfa inyectable se perfila como una futura alternativa fasciolicida para el control de la fasciolosis en rumiantes. Sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales para conocer la dosis letal, corroborar su eficacia en pruebas de gabinete y campo, tolerancia, índice de seguridad y período de retención en rumiantes, a fin de comprobar su verdadero potencial fasciolicida en las especies destino.

CONCLUSIÓN

El compuesto alfa inyectable administrado por vía intramuscular a ratas Hsd Han: Wistar, no produjo cambios importantes en los análisis bioquímicos del suero, la hematología y la estructura histomorfológica en la toxicidad subaguda, al compararlo con los datos reportados en la literatura.

La información obtenida sirve como datos preliminares para indicar que, el compuesto tiene un amplio margen de seguridad.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a la Unidad de Investigación Préclinica (UNIPREC) por su permiso para utilizar sus instalaciones y a MVZ Lucía Macías Rosales, M. C. Claudia P. Rico Torres y al Dr. Miguel Ángel Flores Ramos por su excelente apoyo técnico.

Financiamiento

Esta investigación fue financiada por el proyecto PAPIIT DEGAPA-UNAM RT201015, autorizado a F. Ibarra-Velarde. El financiador no tuvo ningún papel en el diseño del estudio, la recopilación y el análisis de datos, la decisión de publicar o la preparación del manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Beesley NJ, Caminade C, Charlier J, Flynn RJ, Hodgkinson JE. Martinez-Moreno A., Martinez-Valladares M., Perez, J., Rinaldi L., Williams DJL. Fasciola and fasciolosis in ruminants in Europe: Identifying research needs. *Transbound Emerg Dis.* 2017; 1: 199-216.
- 2.-Rosario E. Eficacia de la combinación de closantel y sulfóxido de albendazol contra Fasciolas adultas en caprinos infectados en forma experimental (tesis de licenciatura). México, D,F, México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, Mexico; 2008.
- 3.- Spithill T W S, Smooker PM, Copeman DB. *Fasciola gigantica*: Epidemiology, control, immunology and molecular biology. In J. P. Dalton (Ed.), *Fasciolosis* (pp. 465–525). CABI publishing; 1999.
- 4.- Zumaquero, R.J.L., Sarracent, P.J., Rojas, G.R., Rojas, R.L., Martínez, T.Y., Valero, A.M. (2013). Fascioliasis and Intestinal Parasitoses Affecting Schoolchildren in Atlixco, Puebla State, Mexico: Epidemiology and Treatment with Nitazoxanide. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2013;7(11): e2553. doi: 10.1371/journal.pntd.0002553.
- 5.- . Soulsby E.J.L. *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos.* 7° edición. Interamericana. México; 1987.
- 6.- Quiroz RH. *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos.* Limusa. México; 2009.

- 7.- Vera MY. Fasciolosis en: Editores Ibarra VF, Figueroa JA, Quiroz RH. Parasitología Veterinaria. Volumen 2. Helmintos Editorial Castdel S.A, México; 2010: 57.
- 8.- 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, México; 2008:12.
- 9.- Tum S, Puotinen ML, Skerratt LF, Chan B, Sothoeun S. Validation of a geographic information system model for mapping the risk of fasciolosis in cattle and buffaloes in Cambodia. Vet. Parasitol. 2007;143: 364–367.
- 10.- Dutra LH, Molento MB, Naumann CRC, Biondo AW, Fortes FS, Savio D, Malone JB. Mapping risk of bovine fasciolosis in the south of Brazil using Geographic Information Systems. Vet Parasitol 2010 Apr 19;169(1-2):76-81. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.12.015.
- 11.- Pliego-Suárez LR, Guerrero-Molina C, Quiroz-Romero H, Javier Arriola-Bueno J. Frecuencia de *Fasciola hepatica* en ganaderías de lidia en el estado de Tlaxcala, México. Veterinaria México. 1993; 24 (3): 235-237.
- 12.- Munguía XJA, Ibarra VF, Ducoing WA, Montenegro CN, Quiroz RH. Prevalence of *Fasciola hepatica* (ELISA and fecal analysis) in ruminants from a semi-desert area in the northwest of Mexico. Parasitology Research. 2007;101(1):127-130. doi: 10.1007/s00436-006-0438-y
- 13.- Utrera-Quintana F, Covarrubias-Balderas A, Olmedo-Juárez A, Cruz-Aviña J, Córdova-Izquierdo A, Pérez-Mendoza N, Villa-Mancera A. Fasciolosis prevalence, risk factors and economic losses due to bovine liver condemnation in abattoirs in Mexico. Microbial Pathogenesis. 2022; 173: Part A doi: 10.1016/j.micpath.2022.

- 14.- Oliveira DR, Ferreira DM, Kloss A, Stival CC, Romero F, Ollerenshaw CB. Some aspects of the epidemiology of fasciolosis on Britain. *Pro. Mal. Sci.* 2008; 39: 238–243.
- 15.- William W, Carlton M, Donald MC. *Special veterinary pathology*. 2° edition. Mosby. United States of America. 1995.
- 16.- 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. *Vet. Parasitol.* 2009; 164: 211-216.
- 17.- Boray JC, Crowfoot PD, Strong MB, Allison JR, Schelembaum M, Von Orelli M, Sarasin G. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. *Vet. Rec.* 1983; 113: 315–317.
- 18.- Sumano H, Ocampo L. *Farmacologia Veterinaria*. Mc Graw Hill. México, D.F. 2006
- 19.- Alvarez SMA, Mainar JRC, Pérez GJ, Rojo VFA. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *Veterinary Record.* 2006; 159: 424-425.
- 20.- Overend DJ, Bowen FL. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Australian Veterinary Journal.* 1996; 72: 275-276.
- 21.- 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.
- 22.- Fairweather I, Boray JC. Fasciolicides: Efficacy, Actions, Resistance and its Management. *Vet. Journal.* 1999; 158: 81-112.

- 23.- Turner K, Armour J, Richards RJ. Anthelmintic efficacy of triclabendazole against *Fasciola hepatica* in sheep. *Veterinary Record*. 1984;114:41-42. doi: 10.1136/vr.114.2.41.
- 24.- Ortiz P, Scarcella S, Cerna C, Rosales C, Cabrera M, Guzmán M. Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): a clinical trial and an in vivo efficacy test in sheep. *Veterinary Parasitology*. 2013;195(1-2):118-121. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.01.001.
- 25.- Thomas I, Coles GC, Duffus K. Triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica* in southwest Wales. *Veterinary Record*. 2000;146(7): 200.
- 26.- Ibarra VF, Vera MY, Olazarán JS, Hernández CA, Castillo BR. Fasciolinip-1: experimental fasciolicidal activity in sheep. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 1995;37(2):171-178.
- 27.- Ibarra VF, Montenegro CN, 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 hepática*. *Veterinaria México* 2002; 3(33):237-245.
- 28.- Vera MY, Ibarra VF, Quiroz RH, Hernández CA, 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):1-4. doi: 10.1007/s00436-003-0901-y.
- 29.- Vera MY, Ibarra VF, Liébano HE, Quiroz RH, Castillo BR, Hernández CA. Efficacy of an experimental fasciolicide against immature and mature *Fasciola hepatica* in

- artificially infected calves. *Parasitology Research*. 2004;92(3):211-214. doi: 10.1007/s00436-003-1007-2.
- 30.- Ramírez N, Mayet L, Del Rivero L, Ibarra VF, Castillo R, Hernández CA. Pharmacokinetic behavior in sheep and cattle of 5-chloro-2-(methylthio)-6-(1-naphthoxy)-1H-benzimidazole, a new fasciolicide agent. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2009;32(2):154-159. doi: 10.1111/j.1365-2885.2008.01014.x.
- 31.- Flores Ramos M, Ibarra VF, Hernández CA, Vera MY, Jung CH, Cantó AGJ. A highly water soluble benzimidazole derivative useful for the treatment of fasciolosis. *Bioorganic Medicine Chemistry Letter*. 2014;24(24):5814-5817. doi: 10.1016/j.bmcl.2014.10.017.
- 32.- Flores Ramos M, Ibarra VF, Jung CH, Hernández CA, Vera MY, Castillo R. Novel triclabendazole prodrug: A highly water soluble alternative for the treatment of fasciolosis. *Bioorganic Medical Chemistry Letter*. 2017;27(3):616-619. doi: 10.1016/j.bmcl.2016.12.004.
- 33.- Cordero-Camacho CP, Aristizeibal-Gutierrez FA. Evaluación preliminar in vitro de citotoxicidad de extractos vegetales, empleando métodos colorimétricos In vitro. *Revista Colombiana de Biotecnología* 2002;4(1):100-106.
- 34.- Del Rosario T, -Espinoza E. Estandarización y validación del método HET-CAM para medir la irritabilidad ocular in vitro de los extractos de cinco frutos nativos del Perú utilizados en la industria cosmética. Tesis, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica e.a.p. de Farmacia y Bioquímica. 2015.

- 35.-Camillo DA, Castello BS, De Fátima FM, Melo DR, De Almeida N, Bandeira SH. Biochemical and Hematological Parameters of Wistar Rats and Swiss Mice in the Professor Thomas George Animal Laboratory. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*. 2011;15(2):209-214.
- 36.-Kampfmann I, Bauer N, Johannes S, Moritz A. Differences in hematologic variables in rats of the same strain but different origin. *Veterinary Clinical Pathology*. 2012;41(2):228-234. doi: 10.1111/j.1939-165X.2012.00427.x.
- 37.-Faria J, Barbosa J, Leal S, Afonso LP, Lobo J, Moreira R. Effective analgesic doses of tramadol or tapentadol induce brain, lung and heart toxicity in Wistar rats. *Toxicology*. 2017;385:38-47. doi: 10.1016/j.tox.2017.05.003
- 38.-Ishtiaq S, Akram M, Kamran SH, Hanif U, Afridi MSK, Sajid-Ur-Rehman. Acute and sub-acute toxicity study of a Pakistani polyherbal formulation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2017;17(1):387, pp 1-13 doi: 10.1186/s12906-017-1889-7.