

Eficacia fasciolicida de dos compuestos de síntesis química *in vitro* e *in vivo* en ovinos

Froylán Ibarra Velarde*
Eliseo García Sánchez*
Manuel Fernández Ruvalcaba*
Yolanda Vera Montenegro*
Rafael Castillo Bocanegra**
Alicia Hernández Campos**

Abstract

Fascioliscide activity of 6-chloro-5-(1-naphthoxy)-2-methyltiobencimidazol called Alfa and 6-chloro-5-(2-naphthoxy)-2-methyltiobencimidazol called Beta was evaluated under *in vitro* and *in vivo* conditions in sheep. *In vitro* efficacy was determined for both compounds using excisted *Fasciola hepatica* metacercariae at concentrations of 50, 10, 3.33, 1.11 and 0.37 mg/L. Efficacy was assessed by comparing the survival of the flukes after a four day period of the exposition to the chemicals. Compound Alfa showed an efficacy of 100, 100, 77.5, 0.0 and 0.0%, and compound Beta of 100, 67.5, 1.75, 0.0 and 0.0%, respectively. For the *in vivo* evaluation, forty five crossbred sheep were used and infected with 150 metacercariae each. Eight weeks after the initial infection, when all animals were positive to *Fasciola* eggs, the sheep were randomly divided in 5 groups of 9 animals each. Groups 1 and 2 were treated orally with 10 and 15 mg/kg of compound Alfa, respectively. Groups 3 and 4 were dosed orally with 10 and 15 mg/kg of compound Beta, respectively. Group 5 remained as the non-treated control. Two weeks after the treatment, all sheep were euthanized in order to collect and count the flukes in the liver. The efficacy was determined as the percentage of flukes reduced in the treated groups in comparison to the control one. Results showed an efficacy of 80.6% and 86.9% for Groups 1 and 2 respectively, and of 0.0% for Groups 3 and 4, respectively. Measurements of the fluke's length and liver weight did not show any adverse effects attributable to the treatments. It is concluded that under *in vitro* and *in vivo* conditions, compound Alfa exerted remarkable efficacy, and compound Beta only showed an acceptable one under the *in vitro* testing.

Key words: *FASCIOLA HEPATICA*, EXPERIMENTAL CHEMOTHERAPY, SHEEP.

Resumen

Se evaluó la eficacia fascioliscida del 6-cloro-5-(1-naphthoxy)-2-methyltiobencimidazol, denominado compuesto alfa, y del 6-cloro-5-(2-naphthoxy)-2-methyltiobencimidazol, denominado beta, bajo condiciones *in vitro* e *in vivo*. Para ambos compuestos la eficacia *in vitro* se evaluó a concentraciones de 50, 10, 3.33, 1.11 y 0.37 mg/L, utilizando metacercarias de *Fasciola hepatica* desenquistadas. La eficacia se determinó con base en la sobrevivencia de estos cuatro días posexposición a los químicos. El compuesto alfa mostró una eficacia de 100%, 100%, 77.5%, 0.0% y 0.0% y el compuesto beta de 100%, 67.5%, 1.75%, 0.0% y 0.0%, respectivamente. Para la evaluación *in vivo*, se utilizaron 45 ovinos criollos, los cuales fueron infectados cada uno con 150 metacercarias de *Fasciola*

Recibido el 18 de febrero de 1997 y aceptado el 7 de julio de 1997.

* Proyecto Fasciolosis, CENID-Parasitología, INIFAP/SAGAR, km 11.5, Carretera Cuernavaca-Cuautla, 62500, Morelos, México.

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

hepatica. Dos meses después, cuando todos los ovinos se diagnosticaron positivos a los huevos del parásito mediante la prueba de sedimentación, los borregos se subdividieron en 5 grupos de 9 animales cada uno. Los grupos 1 y 2 fueron tratados con 10 y 15 mg/kg/vía oral del producto alfa, respectivamente. Los grupos 3 y 4 fueron dosificados con 10 y 15 mg/kg/vía oral del compuesto beta, respectivamente. El grupo 5 fungió como testigo sin tratamiento. Quince días posteriores al tratamiento, los ovinos se sacrificaron para colectar y cuantificar las *fasciolas* en el hígado. La eficacia fue determinada como porcentaje de reducción de *fasciolas* en los grupos tratados con respecto al testigo. Los resultados indicaron una eficacia de 80.6% y 86.9% para los grupos 1 y 2, respectivamente, y de 0.0% para los grupos 3 y 4, respectivamente. Mediciones de la longitud de *fasciolas* y peso del hígado, no mostraron algún efecto adverso atribuible a los tratamientos. Se concluye que el compuesto alfa bajo condiciones *in vitro* e *in vivo*, mostró una eficacia fasciolicida altamente promisoriosa y el compuesto beta solamente eficacia aceptable en el escrutinio *in vitro*.

Palabras clave: *FASCIOLA HEPATICA*, QUIMIOTERAPIA EXPERIMENTAL, OVINOS.

Introducción

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria ocasionada por *Fasciola hepatica*, trematodo del parénquima del hígado y conductos biliares de los herbívoros domésticos y silvestres, que ocasionalmente infecta al hombre. Su relevancia radica en las grandes pérdidas económicas que produce a la ganadería mundial.^{1,2} Su control se ha basado en el tratamiento químico, utilizando para ello un considerable número de compuestos fasciolicidas que tienen un uso limitado, reducido espectro de acción, escasa seguridad, alto costo y en ocasiones impráctico sistema de dosificación.^{3,4} En México se ha estado trabajando en el diseño, síntesis y evaluación biológica de diversos compuestos, buscando eficacia fasciolicida contra estados adultos y juveniles del parásito.^{5,6,7,8} Del escrutinio de diversos compuestos evaluados bajo condiciones *in vitro* mediante una técnica descrita por Ibarra y Jenkins,⁹ se seleccionaron dos fármacos: Uno denominado alfa, o 6-cloro-5-(1-naphtoxy)-2-methyltiobencimidazol, el cual es un polvo con cristales de color amarillo, su fórmula condensada es C₁₈H₁₃CIN₂OS, su peso molecular es 340.75, soluble en acetona, benceno, tolueno, ligeramente soluble en metanol e insoluble en agua. El compuesto beta, o 6-cloro-5-(2-naphtoxy)-2-methyltiobencimidazol, es un polvo de color amarillo, su fórmula condensada es C₁₈H₁₃CIN₂OS, su peso molecular es 340.75, es soluble en acetona, metanol, tolueno y ligeramente soluble en benceno e insoluble en agua. Ambos compuestos son isoméricos, uno deriva del alfa naftol como materia prima y el otro del beta naftol, razón por la cual comparten igual peso molecular pero sus propiedades y fórmula estructural son distintas. Los objetivos del presente estudio fueron evaluar la eficacia fasciolicida del 6-cloro-5-(1-naphtoxy)-2-methyltiobencimidazol (compuesto alfa) y del 6-cloro-5-(2-naphtoxy)-2-methyltiobencimidazol (compuesto beta) contra metacercarias *in vitro* y contra el parásito adulto en ganado ovino.

Material y métodos

Localización del estudio

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET), del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR).

Evaluación *in vitro*

El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito por Ibarra y Jenkins.⁹ Con ese fin se utilizaron placas de cultivo de 24 pozos de 1 cm de diámetro,* donde se colocaron 1.6 ml de medio de cultivo RPMI 1640. Se colocaron 10 metacercarias desenquistadas (*fasciolas* inmaduras tempranas) en cada pozo, adicionadas en un volumen de 0.2 ml de medio de cultivo bajo condiciones asépticas. Ambos compuestos se probaron a concentraciones de 50, 10, 3.33, 1.11 y 0.37 mg/L, utilizando 4 pozos por concentración. Se dejaron ocho pozos que contenían *fasciolas* sin tratamiento, conformando el grupo testigo. Las placas se colocaron en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire, fueron incubadas a 37°C durante 4 días. El examen de los especímenes se realizó con microscopio invertido, utilizando 40 X de aumento. Dichas *fasciolas* se examinaron cuidadosamente durante los días 1 y 4. El criterio de evaluación de la actividad del compuesto se determinó con base en la motilidad o mortalidad de los trematodos de los pozos tratados, en comparación con las de los pozos testigo.⁹

Evaluación *in vivo*

Animales

Se utilizaron 45 ovinos criollos, de sexo indistinto, entre 10 y 12 semanas de edad, libres de infección por *F. hepatica*, los animales fueron infectados por vía oral con 150 metacercarias del parásito por borrego. Dichas metacercarias fueron obtenidas de caracoles *Lymnaea bulimoides* infecta-

* NUNC Immunoplate Maxisort, Intermed, Dinamarca.

dos en el laboratorio con miracidios de origen bovino, estos últimos se obtuvieron de huevos del parásito colectados de vesículas biliares de bovinos sacrificados en el Rastro Municipal de Toluca, Estado de México.

Compuestos experimentales

El compuesto alfa fue administrado en una dosis única de 10 y 15 mg/kg/vía oral. Por su parte, el compuesto beta se dosificó a razón de 10 y 15 mg/kg/vía oral. Los tratamientos se describen en el diseño experimental.

Exámenes coproparasitológicos

De todos los ovinos se tomaron muestras de heces durante los días 0, 70 y 90 con la finalidad de diagnosticar en 5 g, la positividad o negatividad de las muestras a huevos de *F. hepatica* utilizando la técnica de sedimentación.¹⁰

Desarrollo del experimento

A las 12 semanas de la infección de los animales, éstos fueron divididos al azar en 5 grupos de 9 animales cada uno para realizar los tratamientos de acuerdo con el siguiente esquema:

DISEÑO EXPERIMENTAL

Grupos (n=9)	Número de mc* por ovino	Exámenes coprológicos días			Tratamiento día 75 mg/kg/oral	Sacrificio 15 días pos-tratamiento
		0	70	90		
1	150	X	X	X	Alfa 10	X
2	150	X	X	X	Alfa 15	X
3	150	X	X	X	Beta 10	X
4	150	X	X	X	Beta 15	X
5	150	X	X	X	Testigo	X

* Metacercarias

Evaluación

A los 15 días postratamiento todos los ovinos fueron sacrificados con la finalidad de extraer su hígado para coleccionar y contar el número de vermes presentes, y así determinar el porcentaje de reducción de trematodos en los grupos tratados en relación con el número de parásitos presentes en el grupo testigo.¹¹ Como información complementaria se determinó la longitud de los vermes, para observar si existían diferencias de talla atribuibles al tratamiento, así como el peso promedio del hígado y su correspondiente observación clínica para determinar algún posible efecto adverso de los fármacos administrados.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza, utilizando metodología descrita por Burr-Foster.¹²

Cuadro 1
EFICACIA *in vitro* DE LOS COMPUESTOS ALFA Y BETA CONTRA METACERCARIAS DE *Fasciola hepatica* RECIEN DESENQUISTADAS

Fármaco	Concentración mg/l	Número de fasciolas muertas Pozos*				Promedio ± d.e.**	Eficacia %
		1	2	3	4		
Alfa	50	10	10	10	10	10 ± 0	100 ^c
	10	10	10	10	10	10 ± 0	100 ^c
	3.33	6	6	9	8	7.75 ± 1.25	77.5 ^b
	1.11	0	0	0	0	—	0 ^a
	0.37	0	0	0	0	—	0 ^a
Beta	50	10	10	10	10	10 ± 0	100 ^c
	10	10	8	7	1	6.5 ± 0	65.0 ^b
	3.33	2	1	3	1	1.75 ± 1.95	77.5 ^b
	1.11	0	0	0	0	—	0 ^a
	0.37	0	0	0	0	—	0 ^a
Testigo	—	0	0	0	0	—	0 ^a
	—	0	0	0	0	—	0 ^a

^{a,b,c} = Difieren estadísticamente (P < 0.01).

* 10 metacercarias desenquistadas/pozo.

** Desviación estándar.

Resultados

El Cuadro 1 muestra la eficacia *in vitro* de los compuestos alfa y beta contra *F. hepatica*.

El compuesto alfa, a concentraciones de 50 y 10 mg/L, mostró en ambos casos una eficacia de 100%. Cuando el compuesto fue probado en dilución terciada a concentración de 3.33 mg/L, la eficacia disminuyó a 77.5% y a concentraciones menores no se observó mortalidad de fasciolas (Figura 1).

El compuesto beta, a concentraciones iniciales de 50 y 10 mg/L, confirió una eficacia de 100% y 65.0%, respectivamente. Sin embargo, cuando el fármaco fue evaluado a concentración de 3.33 mg/L, el porcentaje de mortalidad de duelas fue muy bajo, se encontró solamente 1.75%

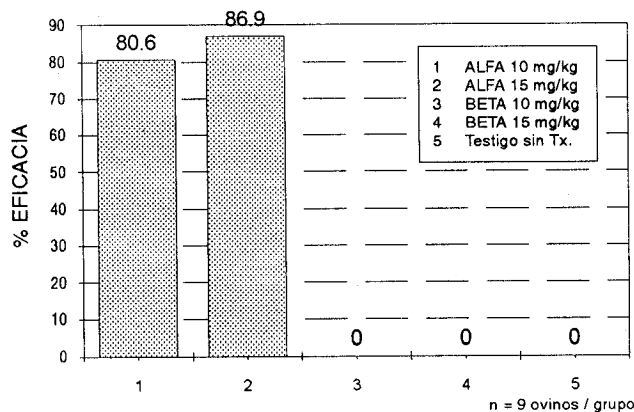


Figura 1. Eficacia de los compuestos alfa y beta contra *Fasciola hepatica* en ovinos infectados experimentalmente.

Cuadro 2
RECUPERACION DE *Fasciola hepatica* EN HIGADO
DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES

Grupo número	Promedio de fasciolas y su desviación estándar	Número de fasciolas colectadas mínimo-máximo	Total de fasciolas recuperadas por grupo
1	3.1 ± 2.8	1-8	28 ^a
2	2.1 ± 2.3	1-5	19 ^a
3	30.1 ± 27.2	3-72	271 ^b
4	16.0 ± 15.2	5-49	145 ^c
5	16.0 ± 9.79	7-37	144 ^c

^{abc} = Difieren estadísticamente (P < 0.01).

de eficacia. A menores concentraciones no se observó eficacia en virtud de que durante el cuarto día de evaluación, todas las fasciolas se encontraban con mayor talla y buena movilidad, como las del grupo testigo (Figura 1).

Recuperación de Fasciolas in vivo y evaluación de la eficacia

Grupo 1

En este grupo el número promedio de *Fasciolas* colectado fue de 3.1 (± 2.8). El número mínimo de trematodos fue de 1 y el máximo de 8, se recuperaron 28 *Fasciolas* en el grupo (Cuadro 2). La eficacia obtenida con el compuesto alfa a la dosis de 10 mg/kg, fue de 80.6% (Figura 1).

Grupo 2

El número promedio de trematodos fue de 2.1 (± 2.3). Los números mínimo y máximo de parásitos fueron de 1 y 5, respectivamente; se recuperaron 19 fasciolas (Cuadro 2). La eficacia ejercida por el compuesto alfa a la dosis de 15 mg/kg fue de 86.9% (Figura 1).

Grupo 3

El número promedio de fasciolas fue de 30.1 (± 27.2). El mínimo y máximo de parásitos recuperados fue de 3 y 72, respectivamente. En este grupo se colectó el mayor número de fasciolas: 271 trematodos (Cuadro 2). La eficacia conferida por el compuesto beta utilizando dosis de 10 mg/kg fue de 0.0% (Figura 1).

Grupo 4

Para este grupo el promedio de fasciolas obtenidas fue de 16 (± 15.2). Los números mínimo y máximo de parásitos colectados fueron de 5 y 49, respectivamente, con un total de 145 fasciolas recuperadas (Cuadro 2). La eficacia del compuesto beta para este grupo utilizando dosis de 15 mg/kg fue de 0.0% (Figura 1).

Cuadro 3
PORCENTAJE DE ANIMALES POR GRUPO POSITIVO
A HUEVOS DE *Fasciola hepatica* ANTES Y DESPUES
DEL TRATAMIENTO

Grupos	Semanas antes del tratamiento			Tratamiento 12	Postratamiento 14
	0	9	10		
1	0	55.5	77.7	100	100
2	0	55.5	55.5	100	100
3	0	66.6	77.7	100	100
4	0	33.3	66.6	100	100
5	0	33.3	66.6	100	100

Grupo 5

El número promedio de fasciolas fue de 16 (± 9.7), con un mínimo de 7 y un máximo de 37 trematodos, se recuperaron 144 parásitos por grupo (Cuadro 2).

El estudio estadístico indicó diferencias significativas de los grupos 1 y 2, respecto de los grupos 3, 4 y 5 (P < 0.01).

Evaluación coproparasitoscópica

El Cuadro 3 muestra los porcentajes de animales positivos a huevos de *Fasciola hepatica*, antes y después del tratamiento con los compuestos experimentales.

Grupo 1

En la semana nueve el 55.5% de animales resultaron positivos a huevos de *Fasciola*. En la semana diez 77.7% excretaban huevos del parásito y en las semanas 12 y 14, el 100% de los borregos estuvieron positivos a huevos de *F. hepatica*.

Grupo 2

En este grupo se determinaron porcentajes de positividad de ovinos a huevos de *F. hepatica* en 55.5, 55.5, 100 y 100 para las semanas 9, 10, 12 y 14 posinfección, respectivamente.

Grupo 3

Los porcentajes de positividad obtenidos fueron 66.6, 77.7, 100 y 100, para las semanas 9, 10, 12 y 14 posinfección, respectivamente.

Grupo 4

Para este grupo, los porcentajes correspondientes de positividad a *F. hepatica*, oscilaron en el orden de 33.3, 66.6, 100 y 100 para las semanas 9, 10, 12 y 14, respectivamente.

Grupo 5

A las nueve semanas posinfección, 33.3% de animales eran positivos. En la décima semana, este porcentaje aumentó a 66.6 y en las semanas 12 y 14, los porcentajes aumentaron a 100, respectivamente, manteniéndose así hasta su sacrificio.

Longitud de fasciolas

La distribución en la talla de fasciolas osciló entre 14 y 27 mm para el grupo 1, entre 9 y 24 mm en el grupo 2, entre 11 y 27 mm en el grupo 3, entre 10 y 27 mm en el grupo 4, y entre 12 y 29 mm en el grupo 5. No se observó predominancia en determinada longitud de los parásitos. Sin embargo, el grupo testigo mostró mayor homogeneidad de tallas. Asimismo, se colectaron 21 fasciolas ubicadas en una talla menor a los 14 mm (3.6%), 553 trematodos, entre 15 y 25 mm (95%), y solamente 8 parásitos mayores a 26 mm (1.37%) (Cuadro 4).

Longitud de fasciolas	Número de fasciolas	Porcentaje
Menores de 14 mm	21	3.6
15 a 25 mm	553	95
Mayores de 26 mm	8	1.3

Al analizar los datos estadísticamente, se observó que el grupo 1 tuvo el mayor promedio de longitud de *fasciolas*; sin embargo, no se detectaron diferencias significativas cuando se compararon los datos de los otros grupos ($P > 0.01$).

El grupo 2 tuvo el menor número de fasciolas y también el menor promedio de longitud de las mismas.

Peso del hígado

Los pesos promedio de hígado oscilaron entre 402 gramos (grupo 2) y 570 gramos (grupo 3). Las desviaciones estándar para ambos grupos fueron también muy variadas (± 147 y ± 127), no encontrándose diferencia significativa ($P > 0.01$) en el peso de los grupos analizados.

Discusión

La eficacia *in vitro* conferida por los dos compuestos experimentales a concentraciones de 50 y 10 mg/L, puede considerarse relevante, particularmente la obtenida con el compuesto alfa en virtud de que en el primer día de exposición de fasciolas al fármaco, los parásitos se

observaban severamente afectados y en el segundo día de observación las fasciolas estaban prácticamente destruidas. Ibarra-Velarde¹³ utilizando el mismo sistema de evaluación, determinó la eficacia de fasciolicidas como disophenol, nitroxinil, meniclofolan, bromofenofos, bithionol, oxyclozanida, rafoxanida y albendazol contra fasciolas inmaduras tempranas, encontrando que a concentraciones de 50 mg/L los compuestos no mostraron eficacia. El resultado encontrado en este trabajo puede considerarse importante, en virtud de que sólo diamfenetide y triclabendazol han demostrado ser eficaces contra fasciolas inmaduras tempranas.¹⁴

En relación con la evaluación *in vivo*, se observó que durante la conducción de este experimento, los grupos de ovinos tratados con 10 y 15 mg/kg del compuesto alfa, mostraron un menor número de parásitos, se consideró a esta eficacia obtenida (80.6% y 86.9%, respectivamente) como aceptable.

Respecto del compuesto beta, los resultados obtenidos fueron decepcionantes, en virtud de que, como se señaló, varios de los ovinos presentaron un gran número de fasciolas, incluso en ocasiones mayor a las colectadas en algunos de los borregos del grupo testigo. Por otro lado, es pertinente mencionar que el vehículo en que se suspendió el compuesto llevaba como solvente al Dimetil sulfóxido (DMSO) al 5% en agua destilada y se observó que al formularse el fármaco, éste presentaba grumos. Se ignora si ésta pudiera ser una de las razones del porqué esa eficacia resultó nula. De momento se desconoce si el compuesto realmente tiene cierto potencial antifasciola; y por ende, no se debe descartar la posibilidad de evaluarlo de nuevo utilizando otro vehículo para formular y mejorar la suspensión, ya que, como es sabido, ningún compuesto de los bencimidazoles es soluble en agua.¹⁵

Es pertinente mencionar que en todos los grupos tratados, no se observaron reacciones clínicas secundarias postratamiento.

Por otro lado, en relación con el compuesto alfa, se considera que su eficacia todavía es factible de mejorarse si se añade un vehículo adecuado para formular el compuesto. De hecho ya se está conduciendo un estudio para dilucidar este aspecto.

Con respecto al análisis coproparasitológico, los huevos de *fasciola* se comenzaron a observar desde la semana 9 posterior a la infección, tal y como se señala en el ciclo evolutivo del parásito.² Aquí se pudo constatar que los ovinos tratados con el compuesto alfa excretaban menor cantidad de huevos que los borregos del grupo beta y testigo. Esto indica que aun cuando no es posible determinar la eficacia de un compuesto a través del número de huevos excretados, proporciona un indicio de que al encontrarse pocos huevos del parásito en heces indica que se ha ejercido un determinado efecto por parte del fármaco. Sin embargo, la utilización de la prueba controlada a través del sacrificio de los animales sigue siendo el mejor parámetro para evaluar el porcentaje de reducción de *fasciolas* respecto de un grupo testigo.¹¹

Los datos obtenidos referente a la longitud de fasciolas permitieron observar, en forma general, una distribución sin predominancia de talla por grupo, lo cual indica que el fármaco no ejerció algún aparente efecto inhibitorio en el desarrollo de los trematodos. Esta observación concuerda con aquellas realizadas por Chauvin.¹⁶

Los pesos de hígado registrados no mostraron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.01$) entre grupos. De hecho las vísceras mostraban un estado aceptable, indicando con ello que los compuestos administrados no ejercieron algún efecto tóxico. En lo referente a la observación de ligeras fibrosis e inflamación observadas en algunos de los hígados, fue atribuida a la migración del parásito en el parénquima hepático, en virtud de que también los hígados del grupo testigo mostraron similar sintomatología.

El presente estudio aporta resultados promisorios que sugieren continuar con otras evaluaciones biológicas para dilucidar la eficacia real del compuesto alfa contra los estadios inmaduros tempranos, juveniles y adultos de *F. hepatica* en ovinos y bovinos, lo cual pudiera conducir al desarrollo de un compuesto fasciolicida de síntesis mexicana.

Se concluye que el compuesto alfa bajo condiciones *in vitro* e *in vivo*, mostró una eficacia alta antifasciola; por su parte, el compuesto beta solamente demostró eficacia aceptable *in vitro*.

Referencias

1. Soulsby EJJ. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. 7a ed. México (DF): Nueva Editorial Interamericana, 1987.
2. Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, Jennings FW. Veterinary parasitology. 5th ed. London: Longman Scientific & Technical, 1992.
3. Bruce JI. New anthelmintics. Int J Parasitol 1987;17:131-136.
4. Gibson TE. Factors influencing the application of anthelmintics in practice. Vet Parasitol 1980;6:241-254.
5. Ibarra-Velarde VF, Vera-Montenegro Y, Hernández-Campos A, Castillo-Bocanegra R. Síntesis de un compuesto fasciolicida experimental y su evaluación *in vitro* e *in vivo* en conejos. Téc Pecu Méx 1995;33:17-24.
6. Ibarra-Velarde OF, Vera-Montenegro Y, Olazarán-Jenkins S, Hernández-Campos A, Castillo-Bocanegra R. Fasciolinip-1: Eficacia fasciolicida experimental en ovinos. Rev Latinoam Microbiol 1995;37:171-178.
7. Ibarra-Velarde OF, Vera-Montenegro Y, Olazarán-Jenkins S, Hernández-Campos A, Castillo-Bocanegra R. Fasciolinip-2: Eficacia fasciolicida experimental en ovinos. Parasitología Día 1995;19:113-118.
8. Ibarra-Velarde VF, Vera-Montenegro Y, Hernández-Campos A, Castillo-Bocanegra R. Eficacia de un compuesto experimental contra *Fasciola hepatica* juvenil y adulta en ganado ovino. Vet Méx 1996;27:119-122.
9. Ibarra OF, Jenkins DC. An *in vitro* screen for new fasciolicidal agents. Z Parasitenk 1984;70:655-671.
10. Nemeseri H. Diagnóstico parasitológico veterinario. Zaragoza (España): Acribia, 1974.
11. Wood IB, Amaral NK, Bairden K, Duncan JL, Kassai J, Malone JB, Pankavich JA, Reinecke RK, Slocombe O, Taylor SM, Vercruyssen J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine and caprine). Vet Parasitol 1995;58:181-213.
12. Burr-Foster Q. Analysis of variance. In: Anderson VH, McLean RA, editors. Design of experiments: a realistic approach. New York: Marcel-Decker, 1974:46-64.
13. Ibarra-Velarde OF. Chemotherapeutical studies on helminths (thesis). London: Univ Brunel, 1983.
14. Tuner RJ, Armour RJ. Anthelmintic efficacy of triclabendazole against *Fasciola hepatica* in sheep. Vet Rec 1984;114:31-42.
15. Van den Bossche H, Rochelle F, Horig C. Mebendazole and related anthelmintics. Adv Pharmacol Chemother 1982;19:67-73.
16. Chauvin A. Responses immunitaires locale et générale chez le mouton infesté expérimentalement par *Fasciola hepatica* Linné, 1758 (tesis doctoral). Tours (France): Univ Tours, 1994.