

Eficacia fasciolicida del compuesto "alfa" contra estadios juveniles y adultos en ovinos

Froylán Ibarra Velarde*
Yolanda Vera Montenegro*
Alicia Hernández Campos**
Rafael Castillo Bocanegra**

Abstract

Fascioliscide activity of the compound 6-chloro-5-(1-naphthoxy)-2-methyltiobencimidazole, called alfa, was evaluated against four- and eight week-old flukes in sheep. Fifty crossbred sheep were used and infected each orally with 200 *F. hepatica* metacercariae. Four weeks postinfection, all animals were reinfected again with 200 metacercariae each. Eight weeks after the initial infection, when all animals were positive to *Fasciola* eggs, they were randomly divided into 5 groups of 10 sheep each. Groups 1 to 4 were treated orally with 10, 15, 22.2 and 30 mg/kg of compound alfa, 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. Efficacy was determined as the percentage of fluke reduction in the treated groups in comparison to the control one. Results showed that at doses of 10, 15, 22.2 and 30 mg/kg of live weight, compound ALFA removed 4 week-old flukes in 82.2%, 87.2%, 90.8% and 94.3%, respectively; and 8 week-old flukes were removed in 81.7%, 88.1%, 87.2% and 90.0%, respectively. Average efficacy for both 4- and 8-week old stages was 82.0%, 87.6%, 89.2% and 92.4% for the four concentrations, respectively. It is concluded that the efficacy exerted by compound alfa was acceptable in terms of fascioliscide activity; being the dose of 15 mg/kg the most suitable one.

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

Resumen

Se evaluó la actividad fasciolicida del 6-cloro-5-(1-naphtoxy)-2-methyltiobencimidazol, denominado compuesto alfa, contra fasciolas de 4 y 8 semanas de edad en ovinos. Se utilizaron 50 ovinos criollos, los cuales se infectaron oralmente con 200 metacercarias de *F. hepatica*. Cuatro semanas después de la infección, todos los ovinos fueron reinfectados cada uno con otras 200 metacercarias. Ocho semanas después a la infección inicial, cuando todos los animales estaban positivos a huevos del parásito, fueron divididos al azar en 5 grupos de 10 animales cada uno. Los grupos 1 al 4, fueron tratados oralmente con el compuesto a una dosis de 10, 15, 22.2 y 30 mg/kg de peso corporal, respectivamente. El grupo 5 permaneció como testigo sin tratamiento. Dos días después del tratamiento, todos los ovinos fueron sacrificados con el fin de coleccionar y contar las fasciolas presentes en el hígado. La eficacia se determinó como porcentaje de reducción de fasciolas en los grupos tratados, en comparación con el testigo. Los resultados mostraron que a dosis de 10, 15, 22.2 y 30 mg/kg de peso vivo, el compuesto alfa removió fasciolas de 4 semanas de edad en un 82.2%, 87.2%, 90.8%, y 94.3% y fasciolas de 8 semanas en 81.7%, 88.1%, 87.2% y 90.0%, respectivamente. La eficacia promedio para

Recibido el 25 de febrero de 1997 y aceptado el 8 de julio de 1997.

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

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

ambos estadios de 4 y 8 semanas fue de 82.0%, 87.6%, 89.2 y 92.4%, para las respectivas concentraciones. Se concluye que la eficacia fasciolicida, conferida por el compuesto alfa a las dosis administradas, fue moderadamente aceptable, siendo la dosis de 15 mg/kg la más idónea.

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

Introducción

La fasciolosis causada por *Fasciola hepatica* ocurre principalmente en el ganado ovino y bovino de todo el mundo.¹ Su relevancia radica en cuantiosas pérdidas económicas que se producen por causas directas e indirectas evaluadas en mortalidad, baja producción de carne y leche, abortos y particularmente en el decomiso de hígados en el rastro cuando los animales son llevados a sacrificio, entre otras.^{2,3}

El control de esta parasitosis se realiza generalmente mediante el tratamiento con fasciolicidas, los cuales en su mayoría afectan al parásito adulto. Los parásitos inmaduros son de vital importancia en virtud de que al invadir el hígado, causan el mayor daño durante las primeras 10 semanas,⁴ de ahí la necesidad de contar con compuestos indicados contra los estadios inmaduros tempranos del parásito.⁵

En el Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET), del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), y en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, se ha estado trabajando en el diseño, síntesis y evaluación biológica *in vitro* e *in vivo* de diversos compuestos, en la búsqueda de eficacia fasciolicida contra estadios adultos y juveniles.^{4,6,7,8,9} En un estudio reciente (por publicarse) se determinó que un compuesto experimental denominado alfa, administrado a ovinos por vía oral y a dosis de 10 y 15 mg/kg, confirió una eficacia de 80.6% y 86.9%, contra fasciolas adultas de 10 semanas, respectivamente. Estos resultados motivaron a realizar el presente estudio que tuvo como objetivo evaluar la eficacia fasciolicida del compuesto alfa a diferentes dosis, contra fasciolas juveniles de 4 semanas de edad y adultas de 8 semanas en ovinos infectados experimentalmente.

Material y métodos

Localización del estudio

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

Animales

Se utilizaron 50 ovinos criollos de indistinto sexo de 10 a 12 semanas de edad, libres de infección por *F. hepatica*,

los cuales fueron infectados al día 0 por vía oral con 200 metacercarias del parásito por ovino administradas en cápsula de gelatina. En la semana 4, los ovinos fueron re infectados con otras 200 metacercarias por animal. Dichas metacercarias fueron obtenidas de caracoles *Lymnaea bulimoides* infectados en el laboratorio con miracidios de origen bovino, estos últimos fueron obtenidos de huevos del parásito colectados de vesículas biliares obtenidas en el Rastro Municipal de Toluca, Estado de México.

Tratamiento

Ocho semanas después de la primera infección con metacercarias, cuando los ovinos resultaron positivos a la eliminación de huevos del parásito en heces,¹⁰ los animales fueron divididos al azar en 5 grupos de 10 animales cada uno y se procedió a administrar los tratamientos. Los grupos 1, 2, 3 y 4 recibieron el compuesto alfa por vía oral en una dosis única de 10, 15, 22.5 y 30 mg/kg de peso corporal, respectivamente, administrado en una suspensión de dimetilsulfóxido al 5% en agua destilada. El grupo 5 quedó como testigo sin tratamiento.

Examen coproparasitoscópico

En las semanas 0, 8 y 10, se tomaron muestras de heces de cada ovino, para analizarlas mediante la técnica de sedimentación,¹⁰ contabilizando el número de huevos presentes en un total de 5 g de heces/ovino.

Las actividades correspondientes se llevaron a cabo de acuerdo al siguiente esquema:

DISEÑO EXPERIMENTAL

Grupos (n = 10)	No. de metacercarias de <i>F. hepatica</i> /ovino		Exámenes coprológicos Semanas			Tratamiento sem. 8 mg/kg/oral	Sacrificio 2da. sem. posttrat.
	Día 0	Día 30	0	8	10		
1	200	200	X	X	X	10	X
2	200	200	X	X	X	15	X
3	200	200	X	X	X	22.5	X
4	200	200	X	X	X	30	X
5	200	200	X	X	X	Testigo	X

Examen a la necropsia

Quince días después del tratamiento con el compuesto experimental, los animales se sacrificaron para colectar del hígado las *F. hepatica* presentes, determinando como juveniles aquellas fasciolas menores a 14 mm de largo, y como fasciolas adultas aquellas con longitud superior a 14 mm, siguiendo la metodología descrita por Boray *et al.*¹¹

Cuadro 1
OBTENCION DE *Fasciola hepatica* DESPUES DEL TRATAMIENTO CON EL COMPUESTO ALFA EN OVINOS
INFECTADOS EN FORMA EXPERIMENTAL

Grupo	Dosis mg/kg oral	Número de fasciolas								
		Juv**	Mín.-Máx	x	D.S. ± E.E.***	Adultas	Mín.-Máx.	x	D.S. ± E.E.	Total
1	10	25	1-11	2.5	4.2 ± 1.3	20	0-7	2.0	2.5 ± 0.8	45
2	15	18	0-4	1.8	1.5 ± 0.4	13	0-4	1.3	1.4 ± 0.4	31
3	22.5	13	0-6	1.3	1.9 ± 0.6	14	0-6	1.4	1.9 ± 0.6	27
4	30	8	0-3	0.8	1.3 ± 0.4	11	0-4	1.1	1.4 ± 0.4	19
5	—	140	7-24	14.0	4.8 ± 1.5	109	4-33	10.9	8.4 ± 2.6	249

* 10 ovinos/grupo.

** Juveniles

*** Desviación estándar ± Error estándar.

La eficacia se valoró según el porcentaje de reducción de fasciolas de los grupos tratados, con referencia al grupo testigo, utilizando la fórmula descrita por Powers *et al.*¹²

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza, utilizando el método descrito por Burr-Foster.¹³

Resultados

En el grupo 1, tratado con 10 mg/kg del compuesto, se colectaron 25 fasciolas juveniles (\bar{x} 2.5 fasciolas/animal) y 20 fasciolas adultas (\bar{x} 2 Fasciolas/animal), en total 45 parásitos. Asimismo, para todos los grupos se obtuvieron los conteos mínimos y máximos de fasciolas, así como la desviación y error estándar correspondientes (Cuadro 1).

La eficacia alcanzada por el compuesto fue de 82.2%, 81.7% y 82.0%, contra fasciolas juveniles, adultas y su promedio de eficacia global considerando la suma aritmética de los parásitos juveniles y adultos (Figura 1).

En el grupo 2, dosificado con 15 mg/kg del compuesto, se obtuvieron 18 fasciolas juveniles (\bar{x} 1.8 fasciolas/animal), y 13 fasciolas adultas (\bar{x} 1.3 fasciolas/animal), generando un total de 31 parásitos en el grupo (Cuadro 1).

El fármaco confirió un porcentaje de reducción de fasciolas de 87.2%, 88.1% y 87.6% contra trematodos juveniles, adultos y su promedio global, respectivamente, como se indicó antes (Figura 1).

En el grupo 3, tratado con 22.5 mg/kg del compuesto, se colectaron 13 fasciolas juveniles (\bar{x} 1.3 parásitos/animal) y 14 fasciolas adultas (\bar{x} 1.4 fasciolas/animal), obteniendo un total de 27 fasciolas para este grupo (Cuadro 1). Aquí la eficacia obtenida fue de 90.8%, 87.2% y 89.2% contra fasciolas juveniles, adultas y en promedio global, respectivamente (Figura 2).

En el grupo 4, dosificado con 30 mg/kg del compuesto, se colectaron 8 fasciolas juveniles (\bar{x} 0.8 parásitos/animal) y 11 fasciolas adultas (\bar{x} 1.1 fasciolas/animal), obteniendo un total de 19 fasciolas para este grupo (Cuadro 1). La eficacia obtenida fue de 94.3%, 90.0% y 92.4% contra fasciolas juveniles, adultas y en promedio global, respectivamente (Figura 2).

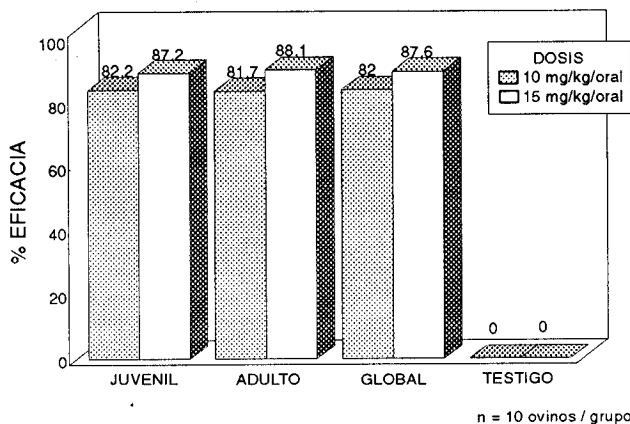


Figura 1. Eficacia del compuesto alfa contra *F. hepatica* de 4 y 8 semanas de edad en ovinos infectados experimentalmente.

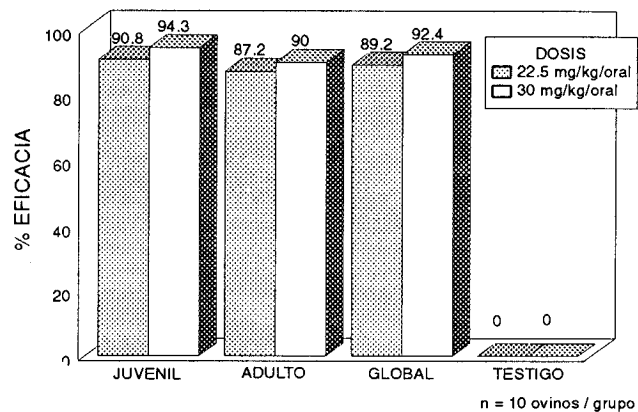


Figura 2. Eficacia del compuesto alfa contra *F. hepatica* de 4 y 8 semanas de edad en ovinos infectados experimentalmente.

Cuadro 2
ANÁLISIS COPROPARASITOSCÓPICO DE OVINOS INFECTADOS EN FORMA EXPERIMENTAL CON *F. hepatica*
Y TRATADOS CON EL COMPUESTO ALFA

Grupo+	Promedio de huevos de <i>F. hepatica</i> / grupo						
	0*	8**	Mín.-Máx.	D.S ± E.E. ^	10***	Mín.-Máx.	D.S. ± E.E.
1	0	27.3	7 - 57	15.8 ± 5.0	9.9	5 - 26	9.2 ± 2.9
2	0	25.5	7 - 47	14.0 ± 4.4	7.4	4 - 19	7.3 ± 2.4
3	0	24.7	6 - 46	13.9 ± 4.4	4.1	1 - 9	4.1 ± 1.1
4	0	24.1	6 - 46	14.0 ± 4.4	1.4	1 - 4	2.0 ± 0.6
5	0	23.6	5 - 42	13.5 ± 4.3	60.9	38 - 93	17.8 ± 5.6

Semanas: * Antes del Tratamiento (Tx),
 ** Semana del Tx.
 ***Después del Tx.
 ^ Desviación estándar ± Error estándar + 10 animales/grupo.

En el grupo 5 (testigo), la colecta de fasciolas juveniles, adultas y en promedio fue de 140 (\bar{x} 14), 109 (\bar{x} 10.9) y 249 (\bar{x} 24.9), respectivamente (Cuadro 1). Asimismo, del total de fasciolas colectadas, el 43.8% eran adultas y el 56.2% eran juveniles.

El resultado de los análisis coproparasitoscópicos en el día 0, fue negativo en todos los animales, demostrando con esto que al inicio del estudio todos los ovinos se encontraban libres de la infección del parásito (Cuadro 2).

Ya en la semana 8, todos los ovinos eran positivos y generaron un promedio de huevos de *F. hepatica* por grupo de 27.3, 25.5, 24.7, 24.1 y 23.6 para los grupos 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente.

Cuando se realizó el mismo análisis en la semana 10, los ovinos de los grupos tratados disminuyeron su producción ovígera; obteniendo promedios de huevos por grupo de 9.9, 7.4, 4.1, y 1.4. En el grupo 5, el promedio de huevos aumentó a 60.9 huevos de *F. hepatica* (Cuadro 2).

El análisis estadístico indicó diferencias significativas ($P < 0.01$) en la eficacia ejercida por el compuesto en los grupos tratados, con respecto al testigo. Esta significancia fue demostrada tanto para fasciolas de 4 semanas de edad como para fasciolas de 8 semanas. Al analizar la información obtenida en forma global, considerando porcentajes promedio de fasciolas de 4 y 8 semanas, se observó diferencia significativa entre dosis ($P < 0.01$). De manera general, el compuesto fue ligeramente más eficaz contra fasciolas juveniles de 4 semanas de edad, que contra fasciolas adultas de 8 semanas.

Discusión

A través del tiempo, los bencimidazoles y probencimidazoles han probado ser altamente efectivos, primordialmente contra una amplia gama de vermes gastrointestinales y pulmonares.¹⁴ Posteriormente, mediante la modificación de su estructura química algunos compues-

tos como albendazol, netobimín, netobimín sulphoxido y particularmente, triclabendazol, han mostrado actividad significativa contra *F. hepatica*.^{15,16}

Novak y Blackburn¹⁷ señalan que la actividad fasciolicida de los bencimidazoles posiblemente se debe a la incorporación de uno o más iones cloro en el anillo bencídico. El compuesto alfa pertenece a los carbamatos bencimidazólicos, y al tener incluido un ion cloro posiblemente parte de su eficacia se deba a éste.

En el presente estudio todas las dosis empleadas del compuesto alfa fueron estadísticamente significativas ($P < 0.01$) al reducir fasciolas en los animales tratados con referencia al testigo. Este hallazgo indica que el compuesto alfa ofrece un potencial para controlar y eliminar infecciones por fasciolas adultas y jóvenes.

Por otro lado, la eficacia conferida por el compuesto a la dosis de 15 mg/kg, fue ligeramente superior a aquellas obtenidas a la misma dosis contra el estadio adulto de fasciola de 10 semanas de edad según Ibarra Velarde⁴ (en prensa).

Wood *et al.*¹⁸ señalan que un compuesto estándar superior al 90% de eficacia se considera como muy bueno, y entre 80% y 90% se califica como moderadamente efectivo. La eficacia conferida por el compuesto alfa puede considerarse dentro del rango de buena en virtud de que el compuesto demostró también ser eficaz contra estadios inmaduros tempranos de 4 semanas de edad, característica no aplicable a la mayoría de fasciolicidas existentes en el mercado.^{2,3,17,19,20,21}

Con base en estos resultados, se confirmó que 15 mg/kg del compuesto alfa parece ser una dosis segura y altamente eficaz contra fasciolas juveniles y adultas, en virtud de haber sido bien tolerada sin observar ningún efecto adverso en los ovinos.

Hasta el momento se desconocen algunos parámetros importantes tales como el grado de absorción del compuesto, tiempo de permanencia en el plasma sanguíneo y

tiempo de eliminación del fármaco, entre otros. Futuros estudios a este respecto contribuirán a mejorar posiblemente la eficacia del fármaco.

En el presente estudio, los porcentajes de eficacia obtenidos contra fasciolas de cuatro semanas fueron ligeramente superiores a los obtenidos contra fasciolas de 8 semanas, indicando cierta semejanza con triclabendazol,* el cual ha mostrado una eficacia superior al 80% contra fasciolas de la misma edad, a dosis de 10 mg/kg de peso.^{4,22}

Estos resultados también muestran similitud con aquellos obtenidos por Kingsbury y Rowlands²³ en el que utilizaron diamfenetida,** la cual ha demostrado ser altamente eficaz contra los estadios juveniles de fasciola en ovinos.

También es pertinente aclarar que el compuesto alfa fue administrado en una suspensión con dimetilsulfóxido al 5% en agua, por lo que se debe trabajar en la obtención de un vehículo adecuado para formular el fármaco con el cual posiblemente se pueda mejorar la eficiencia del compuesto.

Con referencia a la medición de la longitud de fasciolas, ésta fue realizada con la idea de observar posibles diferencias en la talla de los parásitos de grupos tratados; sin embargo, las fasciolas colectadas no parecieron haber sido afectadas en su desarrollo como se ha demostrado con closantel.^{24,25}

Finalmente, la eficacia obtenida con el compuesto alfa es promisoriosa y se requiere realizar futuros estudios para evaluar algunos de los parámetros anteriormente señalados, los cuales posiblemente habrán de contribuir a mejorar la eficacia de este compuesto experimental de diseño y síntesis mexicana.

Se concluye que bajo las condiciones en que se desarrolló el presente estudio, la eficacia fasciolicida, conferida por el compuesto alfa a las dosis administradas, fue aceptablemente buena, siendo la dosis de 15 mg/kg la más idónea.

Referencias

1. Boray JC, Strong MB, Allison J. Chemoprophylaxis of fascioliasis. *Abstr Austr Soc Parasitol* 1981;20:315-317.
2. Quiroz RH. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. México (DF): Limusa, 1984.
3. Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, Jennings FW. *Veterinary parasitology*. 5th ed. London: Longman Scientific & Technical, 1992.
4. Ibarra-Velarde F, García-Sánchez E, Fernández-Ruvalcaba M, Vera-Montenegro Y, Castillo-Bocanegra R, Hernández-Campos A. Eficacia fasciolicida de dos compuestos de síntesis química *in vitro* e *in vivo* en ovinos. *Vet Méx* 1997;28:291-296.
5. Mckellar QA, Kinabo LD. The pharmacology of flukicidal drugs. *Br vet J* 1991;147:306-321.
6. 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.
7. 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.
8. Ibarra-Velarde F, Vera-Montenegro Y, Hernández-Campos A, Castillo-Bocanegra R, Olazarán-Jenkins S. Fasciolinip-2: eficacia fasciolicida experimental en ovinos. *Parasitol Día* 1995;19:113-118.
9. Ibarra-Velarde F, Vera-Montenegro Y, Hernández-Campos A, Castillo-Bocanegra R. Eficacia de un compuesto experimental contra *Fasciola hepatica* juvenil y adulta en ganado ovino. *Vet Méx* 1996;27:119-122.
10. Nemeseri H. Diagnóstico parasitológico veterinario. Zaragoza (España): Acribia, 1974.
11. Boray JC, Crowfoot PD, Strong MB, Allison JR, Schellenbaum M, Orelli von M, Sarasin G. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* in sheep with triclabendazole. *Vet Rec* 1983;113:315-317.
12. Powers KG, Wood IB, Eckert J, Gibson T, Smith HJ. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P). Guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine and ovine). *Vet Parasitol* 1982;70:263-284.
13. Burr-Foster Q. Analysis of variance. In: Anderson VH, McLean RA, editors. *Design of experiments: a realistic approach*. 5th ed. New York: Marcel-Decker, 1974:46-64.
14. Van den Bosche H, Rochette F, Horig C. Mebendazole and related anthelmintics. *Adv Pharm Chemother* 1982;19:67-128.
15. Boray JC, Jackson R, Strong MV. Chemotherapy of fascioliasis with triclabendazole. *NZ vet J* 1985;33:182-186.
16. Craig TM, Huey RL. Efficacy of triclabendazole against *Fasciola hepatica* and *Fascioloides magna* in naturally infected calves. *Am J vet Res* 1984;45:1644-1645.
17. Novak M, Blackburn MJ. Anthelmintic activity of several 5-substituted benzimidazol carbamates against *Hymenolepis nana* cysticercoids. *Experientia* 1981;37:250-255.
18. Wood IB, Amaral NK, Bairden K, Duncan JL, Kassai J, Malone JB, Pankavich JA, Reinecke RK, Slocombe O, Taylor SM, Vercruyss 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.
19. Ibarra-Velarde F, Vera-Montenegro Y. Comparación del efecto extensivo de cinco fasciolicidas en bovinos en clima cálido. *Vet Méx* 1991;22:159-163.
20. Soulsby EJJ. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. 7a ed. México (DF): Nueva Editorial Interamericana, 1987.
21. Gibson TE. Factors influencing the application of anthelmintics in practice. *Vet Parasitol* 1980;6:241-254.
22. Wolf K, Eckert J, Schneider G, Lutz H. Efficiency of triclabendazole against *Fasciola hepatica* in sheep and goats. *Vet Parasitol* 1983;13:145-150.
23. Kingsbury PA, Rowlands AP. Diamphenetide activity against all stages of *Fasciola hepatica* in sheep. *Br vet J* 1971;128:235-241.
24. Maes L, Vanparijs O, Lauwers H, Deckers W. Comparative efficacy of closantel and triclabendazole against *Fasciola hepatica* in experimentally infected sheep. *Vet Rec* 1990;127:450-452.
25. Yazwinski TA, Featherstone H, Presson BL, Greenway TE, Pote LM, Holtzen H. Efficacy of injectable Clorsulon in the treatment of immature bovine *Fasciola hepatica* infections. *Agri-Practice* 1985;6:6-9.

* Fasinx®, Ciba Geigy.

**Coriban®, Wellcome.