

EVALUACIÓN DE CUATRO VEHÍCULOS PARA FORMULAR UN FASCIOLICIDA EXPERIMENTAL

Froylán Ibarra Velarde *
Natividad Montenegro Cristino *
Jaime Flores Crespo *
Alicia Hernández Campos **
Rafael Castillo Bocanegra **

Abstract

The aim of the present study was to select from four vehicles the most suitable one to formulate an experimental fascioliscide called Alfa. Twenty five fluke-free crossbred sheep were used. On day zero, all animals were infected orally with 200 metacercariae of *F. hepatica* administered in a gelatin capsule. Only 15 sheep were reinfected each with another 200 metacercariae on week six. Sheep were divided ten weeks after the infection in five groups of five animals each, providing that from the 15 reinfected animals 10 were included in Groups 1 and 2, and the remaining five ones were left in the control one. Groups 1 to 4 were treated with an oral dose of 15 mg/kg of body weight of the experimental compound, formulated with vehicles 1, 2, 3 and 4, respectively, and Group 5 remained as the non-treated control one. All sheep were sacrificed two weeks after the treatment, and all flukes in the liver were quantified. Efficacy was determined as the percentage of fluke reduction. Results showed an efficacy against adult flukes of 100%, 100%, 92.4% and 77.0%, for Groups 1, 2, 3 and 4, respectively, and against juvenile flukes of 100% and 100% for Groups 1 and 2, respectively. It is concluded that compound Alfa formulated in vehicles number 1 and 2 exerted a 100% efficacy against four week-old and 10 week-old flukes in sheep.

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

Resumen

El objetivo del presente estudio fue seleccionar entre cuatro vehículos, el idóneo para formular un fasciolicida experimental denominado Alfa. Se utilizaron 25 ovinos criollos, libres de infección por *F. hepatica*, los cuales en el día 0, fueron infectados por vía oral con 200 metacercarias del parásito por borrego, administradas en cápsula de gelatina. En la semana 6, sólo 15 ovinos fueron reinfectados con otras 200 metacercarias por animal. Diez semanas después de la primera infección, los borregos fueron divididos en cinco grupos de cinco animales cada uno, previendo que de los 15 ovinos reinfectados, 10 quedaran insertos en los grupos 1 y 2, y los 5 restantes quedaran dentro del grupo testigo. Así, los grupos 1 al 4 fueron dosificados por vía oral, con 15 mg/kg del compuesto experimental, formulado con los vehículos 1, 2, 3 y 4, respectivamente, y el grupo 5 fungió como testigo, sin tratamiento. A las dos semanas postratamiento, se sacrificaron los ovinos y se cuantificaron las fasciolas en hígado. La eficacia se determinó con base en el porcentaje de reducción de fasciolas. Los resultados indicaron una eficacia contra fasciolas adultas, de 100%, 100%, 92.4% y 77.0%, para los grupos 1, 2, 3 y 4, respectivamente, y contra fasciolas juveniles de 100% y 100%, para los grupos 1 y 2, respectivamente. Se concluye que el

Recibido el 10 de agosto de 1999 y aceptado el 29 de noviembre de 1999.

* Proyecto Fasciolosis, Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias de la Secretaría de Ganadería, Agricultura y Desarrollo Rural, km 11.5, Carretera Cuernavaca-Cuatla, Morelos, 62500, México.

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

compuesto Alfa formulado con los vehículos 1 y 2, mostró una eficacia del 100% contra fasciolas de 4 y 10 semanas de edad en ovinos, respectivamente.

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

Introducción

En virtud de la importancia económica que reviste la fasciolosis en México,^{1,2} la industria farmacéutica ha introducido en el mercado un considerable número de compuestos fasciolicidas³, los cuales o son importados, o se producen en México con materias primas traídas del extranjero⁴. Por tal razón, es importante desarrollar un compuesto fasciolicida en el país.

En el Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CENID-PAVET del INIFAP), se ha estado realizando el escrutinio *in vitro* e *in vivo* de diversos compuestos de síntesis química, los cuales se han sintetizado en colaboración con la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, con la finalidad de determinar el efecto potencial fasciolicida.⁵⁻⁸ Estos fármacos son derivados bencimidazólicos que muestran cierta similitud al triclabendazol⁹, compuesto que ha mostrado ser uno de los fasciolicidas más eficaces, en virtud de extender su efecto contra todos los estadios evolutivos de *Fasciola hepatica*^{2,10,11}

De la selección *in vitro* de estos compuestos previamente sintetizados, surgieron dos productos con aceptable eficacia, que motivaron a llevar su evaluación biológica *in vivo*, en ovinos infectados experimentalmente con *F. hepatica*, uno el 5-cloro-6-(1-naftoxi)-2-metiltiobencimidazol, al cual se le denominó compuesto Alfa, y dos el 5-cloro-6-(2-naftoxi)-2-metiltiobencimidazol, o compuesto Beta. Cada producto fue probado a las dosis de 10 y 15 mg/kg/vía oral, obteniendo un porcentaje de eficacia de 80.6% y 86.9% y 0.0% y 0.0% para ambos compuestos, respectivamente⁷.

Con la idea de corroborar la eficacia conferida por el compuesto Alfa, se utilizaron 50 ovinos que contenían una infección experimental con fasciolas de 4 y 10 semanas de edad. Los animales se dividieron en 5 grupos de 10 animales cada uno. Los grupos 1 al 4 fueron tratados con el compuesto a una dosis oral de 10, 15, 22 y 30 mg/kg, respectivamente, dejando al grupo 5 como testigo, sin tratamiento. La eficacia se midió como porcentaje de reducción de fasciolas en los grupos tratados con respecto al testigo, obteniendo 82.2%, 87.2%, 90.8% y 94.3% contra fasciolas de 4 semanas de edad y de 81.7%, 88.1%, 87.2% y 90.0% contra fasciolas de 10 semanas de edad, respectivamente¹².

De manera general, se observó que en los estudios anteriormente mencionados, posiblemente la variabilidad de eficacia de los compuestos evaluados podía atribuirse, en parte, a que los fármacos utilizados no se administraban mediante un buen vehículo que transportara al compuesto Alfa en mayores porcentajes, que contribuyeran a obtener una mejor absorción. Por tal razón, el objetivo del presente estudio fue seleccionar entre cuatro vehículos, el más adecuado para formular al fasciolicida experimental Alfa.

Material y métodos

Localización del estudio

El presente trabajo fue realizado en el verano de 1998, en las instalaciones del CENID-PAVET, del INIFAP de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR), localizado en el municipio de Jiutepec, Morelos, que se localiza a 1800 msnm.

Síntesis del compuesto Alfa

La síntesis y formulación de vehículos para el compuesto Alfa se realizó en la Facultad de Química de la UNAM, de acuerdo a lo descrito por Hernández-Campos¹³. Los ingredientes para

formulación son de fácil adquisición en el ámbito nacional, así como los reactivos para realizar la síntesis del compuesto, con excepción de uno; todos son de producción mexicana.

Vehículos para formular al compuesto ALFA

Vehículo 1

Pectina USP	1.5 g
Carboximetilcelulosa (baja viscosidad)	0.5 g
Carboximetilcelulosa (media viscosidad)	0.5 g
Sacarina USP	0.2 g
Metil parabeno	0.5 g
Propil parabeno	0.03 g

Vehículo 2

Carboximetilcelulosa (baja viscosidad)	1.0 g
Carboximetilcelulosa (media viscosidad)	0.4 g
Sacarina USP	0.2 g
Metil parabeno	0.5 g
Propil parabeno	0.03 g
Sacarosa	0.8 g

Vehículo 3

Propil parabeno	0.05 g
Metil parabeno	0.18 g
Azúcar	15 g
Carbopol 940	0.063 g
Goma de tragacanto	0.068 g
Metilcelulosa	0.25 g
Carboximetilcelulosa (media viscosidad)	0.013 g
Avicel PH 101	0.5 g

Vehículo 4

Propil parabeno	0.02 g
Metil parabeno	0.18 g
Carboximetilcelulosa (media viscosidad)	1.2 g

Animales

Se utilizaron 25 ovinos criollos, de sexo indistinto, entre 10 y 12 semanas de edad, libres de infección por *F. hepatica*, los cuales en el día 0 fueron infectados por vía oral con 200 metacercarias del parásito por borrego, administradas éstas en cápsula de gelatina. En la semana 6, sólo 15 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, los cuales a su vez, fueron obtenidos de huevos del parásito colectados de vesículas biliares obtenidas en el rastro de la ciudad de Toluca, Estado de México, México.

Diez semanas después de la primera infección con metacercarias, los ovinos fueron divididos en cinco grupos de cinco animales cada uno, previendo que de los 15 ovinos re infectados, 10 quedaran insertos en los grupos 1 y 2, y los 5 restantes quedaran dentro del grupo testigo.

Los tratamientos fueron administrados en una suspensión a razón de 0.3 ml/kg, que contenía las concentraciones de fármaco de acuerdo con el siguiente esquema: Grupo 1: Cada ovino fue dosificado por vía oral, con 15 mg/kg del compuesto experimental Alfa, formulado con el vehículo 1; grupo 2: Similar al anterior, pero formulado con el vehículo 2; grupo 3: Similar al anterior, pero formulado con el vehículo 3; grupo 4; Similar al anterior, pero formulado con el vehículo 4, grupo 5; Testigo infectado y sin tratamiento.

Quince días después del tratamiento, todos los ovinos fueron sacrificados para colectar las fasciolas presentes en cada hígado.

Evaluación

La eficacia fue medida con base en el porcentaje de reducción de fasciolas presentes en los grupos tratados con referencia al grupo testigo.

La metodología utilizada para la evaluación biológica, se realizó de acuerdo con lo realizado en estudios previos,¹⁴⁻¹⁷ el conteo de trematodos se llevó a cabo de acuerdo con Boray *et al.*¹⁸, y el porcentaje de eficacia se determinó utilizando la fórmula descrita por Wood *et al.*¹⁹

Análisis estadístico

La información obtenida fue sometida a un análisis de varianza, en el cual se compararon tratamientos entre grupos, utilizando la metodología descrita por Burr-Foster²⁰.

Resultados

Eficacia contra fasciolas adultas

En los grupos 1 y 2 (tratamiento formulado con los vehículos 1 y 2, respectivamente), no se colectó ninguna fasciola, por lo que el porcentaje de eficacia fue del 100.

En el grupo 3 (tratamiento formulado con el vehículo 3), se colectaron 21 fasciolas por grupo, con un mínimo de 3 y un máximo de 12 trematodos y un promedio de fasciolas por animal de 4.2. El porcentaje de eficacia obtenido para este grupo fue de 92.4

En el grupo 4 (tratamiento formulado con el vehículo 4), se colectaron 64 fasciolas, obteniendo un mínimo de 13 y un máximo de 45 duelas, generando un promedio de 12.8 parásitos por animal. Aquí el porcentaje de eficacia obtenido para este grupo fue de 77.0.

En relación con el grupo testigo sin tratamiento, se colectaron 276 trematodos, el mínimo y máximo de fasciolas colectadas fue de 31 y 95, respectivamente, generando un promedio de 55.2 duelas por animal.

El análisis estadístico indicó diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los grupos tratados con respecto al testigo, así como entre los grupos 1, 2 y 3 con el grupo 4 (Cuadro 1).

Eficacia contra fasciolas juveniles

En los grupos 1 y 2 (tratamiento formulado con los vehículos 1 y 2, respectivamente), no se colectó ninguna fasciola, por lo que el porcentaje de eficacia fue de 100.

En el grupo 5 (testigo para fasciolas juveniles), se colectaron 110 trematodos. El mínimo y máximo de parásitos obtenidos fue de 9 y 38, respectivamente, generando un promedio de 22.0 duelas por animal.

Los datos obtenidos indicaron alta significancia ($P < 0.01$) entre los grupos tratados y el testigo sin tratamiento (Cuadro 2).

Discusión

La literatura da cuenta de un gran número de fasciolicidas que en su mayoría son efectivos contra el estado adulto del parásito^{8, 21}.

Por otro lado, sólo triclabendazol¹⁸ y diamfenetide²² han mostrado alta eficacia contra los estadios inmaduros tempranos de *F. hepatica*.

En previos estudios en ovinos, el compuesto Alfa mostró actividad promisorio contra estados adultos y juveniles;¹² sin embargo, se contemplaba la necesidad de incluir un vehículo que fuera capaz de llevar el compuesto al hígado en porcentajes aceptables, para producir un efecto mayor. De momento se desconoce la forma en que los vehículos utilizados intervienen en el transporte del compuesto Alfa al hígado y mejoran su eficacia, de hecho ya se están realizando estudios sobre la farmacocinética y toxicidad del compuesto, para conocer los porcentajes de fármaco que se localizan en diferentes órganos y a diferentes intervalos postratamiento.

Se considera que la formulación del compuesto ALFA con el vehículo 1 fue la más adecuada, en virtud de que el fármaco ya formulado se observaba perfectamente homogeneizado, y daba a la suspensión una facilidad de manejo ideal al momento de administrarse.

Aún cuando el fármaco suspendido en el vehículo 2 se observaba sedimentado, y hubo necesidad de agitar fuertemente la formulación, los resultados obtenidos fueron muy buenos. Sin embargo, el compuesto preparado con la formulación 3 tomó un aspecto muy espumoso y se desconoce si esto último influyó para que la eficacia conferida fuera menor a la obtenida con las formulaciones 1 y 2.

En relación con la eficacia conferida por el compuesto formulado con el vehículo 4, se observó que la suspensión se veía con grumos al momento de administrarse, y al compararla con cualquiera de los grupos formulados con los otros vehículos evaluados, el porcentaje de eficacia fue el más bajo por lo que su utilización futura para este compuesto queda descartada.

Jenkins²³ señala que en la búsqueda de un nuevo fármaco, perteneciente a un nuevo grupo químico, es necesario realizar el escrutinio bajo condiciones *in vitro* de aproximadamente 10 000 compuestos, lo cual es una tarea que requiere una gran inversión de tiempo y dinero. En lo referente al compuesto Alfa, se partió de la base de modificar la estructura química de derivados bencimidazólicos, los cuales han mostrado tener efecto fasciolicida, situación que directamente compete al compuesto Alfa.

Los resultados obtenidos en este estudio son altamente promisorios y se espera que en futuras evaluaciones del compuesto en bovinos, muestren similar porcentaje de eficacia.

Se concluye que el compuesto Alfa formulado con los vehículos 1 y 2, mostró una eficacia del 100%, contra fasciolas de 4 y 10 semanas de edad en ovinos, respectivamente.

Agradecimientos

Este trabajo tuvo financiamiento del Proyecto K0004, Desarrollo de un Fasciolicida Experimental, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Referencias

1. Arroyo-Pedraza MC. Incidencia de fasciolosis hepática en 7 rastros del Estado de México (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1991.
2. Encinas-García R, Quiroz-Romero H, Guerrero-Molina C, Ochoa-Galván P. Frecuencia de fasciolosis hepática e impacto económico en bovinos sacrificados en Ferrería, México, D.F. *Vet Méx* 1989;20:423-426.
3. Ibarra OF, Jenkins DC. An *in vitro* screen for new fasciolicidal agents. *Ztschrft Parasitenk* 1984;70:655-661.
4. Ibarra-Velarde F, Vera-Montenegro Y. Comparación del efecto extensivo de cinco fasciolicidas en bovinos en clima cálido. *Vet Méx* 1991;22:159-163.
5. Ibarra-Velarde F, Vera-Montenegro Y, Hernández-Campos A, Castillo-Bocanegra R. Síntesis y evaluación fasciolicida *in vitro* e *in vivo* en conejos de un compuesto experimental. *Téc Pecu Méx* 1995;33:17-24.
6. Ibarra-Velarde F, Vera-Montenegro Y, Olazarán-Jenkins S, Hernández-Campos A., Castillo-Bocanegra R. Fasciolinip-1: eficacia fasciolicida experimental en ovinos. *Rev Latinoam Microbiol* 1995;37:23-28.
7. Ibarra-Velarde F, García-Sánchez E, Fernández-Ruvalcaba M, Vera-Montenegro Y, Castillo-Bocanegra R, Hernández-Campos A. Eficacia fasciolicida *in vitro* e *in vivo* de dos compuestos de síntesis química. *Vet Méx* 1997;28:291-296.
8. Quiroz RH. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. México (DF): Limusa, 1984.
9. Eckert J, Schneider G, Wolf K. FASINEX (Triclabendazole) - A new fasciolicide. *Berl Tierärztl Wschr* 1984;91:349-356.
10. Ibarra-Velarde F, Quiroz-Romero H, Perez-Tapia HJ, Vera-Montenegro Y, Tello- Robles M. Determinación del efecto del triclabendazol, rafoxanide, nitroxinil y meniclofolan en bovinos infectados en forma natural con *Fasciola hepatica*. *Téc Pecu Méx* 1987;25:404-408.
11. Ibarra-Velarde F. Control químico de la fasciolosis. En: Quiroz-Romero H, editor. Diagnóstico y control de parásitos de animales y el hombre. México (DF): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, División del Sistema de Universidad Abierta, Universidad Nacional Autónoma de México, 1991:275-297.
12. Ibarra-Velarde F, Vera-Montenegro Y, Hernández-Campos A, Castillo-Bocanegra R, Vázquez-Pelaez C. Eficacia fasciolicida del compuesto alfa contra estadios juveniles y adultos en ovinos. *Vet Méx* 1997;28:297-301.
13. Hernández-Campos MA. Síntesis de bencimidazoles con actividad antihelmíntica potencial (tesis de maestría). México (DF) México: Facultad de Química. UNAM, 1990.
14. Ibarra-Velarde F, García-Tovar C, Vera-Montenegro Y, Escudero-Corona CJ, Vázquez-Pelaez C. Acción aditiva de dos fasciolicidas en ovinos criollos. *Vet Méx* 1989;20:203-207.
15. Ibarra-Velarde F, Vera-Montenegro Y, Olazarán-Jenkins S, Perez-Tapia H, Casas-Carrillo E. Efecto del posible sinergismo de un inmunógeno de *Fasciola hepatica* y triclabendazol en ovinos. *Vet Méx* 1989;20:197-201.
16. Quiroz-Romero H, Ibarra-Velarde F, Vera-Montenegro Y. Eficacia del triclabendazol contra formas inmaduras de *Fasciola hepatica* y la ganancia de peso en bovinos. *Vet Méx* 1988;19:29-33.
17. Sánchez-Álvarez E, Ibarra-Velarde F, Pérez-Tapia J, Casas-Carrillo E. Evaluación de la ganancia de peso en ovinos infectados experimentalmente con *Fasciola hepatica* y tratados con triclabendazol. *Vet Méx* 1988;19:145-149.
18. Boray JC, Crawfoot PD, Strong MB, Allison JR. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. *Vet Rec* 1983;113:113-115.
19. Wood IB, Amaral NK, Bairden K, Duncan JL, Kassai T, Malone JB, *et al.* World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) 2nd ed. of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants. (Bovine, ovine, caprine). *Vet Parasitol* 1995;58:181-213.
20. Burr-Foster Q. Analysis of variance. In: Anderson VH, McLean RA, editors. Design of experiments: a realistic approach. New York: Marcel Decker, 1984:44-51.
21. Soulsby EJJ. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. México (DF): Interamericana, 1967.
22. Kingsbury PA, Rowlands AP. Diamphenetide activity against all stages of *Fasciola hepatica* in sheep. *Br Vet J* 1971;128:235-241.
23. Jenkins DC. *In vitro* screening tests for anthelmintics. In: Owen DG, editor. Animal models in parasitology. London (UK): MacMillan Press Limited, 1982:173-186.

Cuadro 1

EFICACIA DEL COMPUESTO ALFA FORMULADO CON 4 DIFERENTES VEHÍCULOS EN OVINOS INFECTADOS EN FORMA EXPERIMENTAL CON FASCIOLAS DE 10 SEMANAS DE EDAD					
Grupo (5 animales)	Vehículo	Número de fasciolas colectadas		Promedio de fasciolas	Eficacia
		por grupo	Mín-máx	por animal	(%)
I	1	0	0	0	100c
II	2	0	0	0	100c
III	3	21	3 - 12	4.2	92.4b
IV	4	64	13 - 45	12.8	77b
V	Agua	276	35 - 95	55.2	-----a

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

Cuadro 2

EFICACIA DEL COMPUESTO ALFA FORMULADO CON LOS VEHÍCULOS 1 Y 2 EN OVINOS INFECTADOS EN FORMA EXPERIMENTAL CONTRA <i>Fasciola hepatica</i> DE CUATRO SEMANAS DE EDAD					
Grupo (5 animales)	Vehículo	Número de fasciolas colectadas		Promedio de fasciolas	Eficacia
		por grupo	Mín-máx	por animal	(%)
I	1	0	0	0	100 ^b
II	2	0	0	0	100 ^b
V	Agua	110	9 - 38	22	----- ^a

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