

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSGRADO



UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

TESIS:

EFICACIA DE TRICLABENDAZOL MÁS IVERMECTINA SOBRE *Fasciola hepatica* EN BOVINOS HOLSTEIN FRIESIAN

Para optar el Grado Académico de

MAESTRO EN CIENCIAS

MENCIÓN: SALUD ANIMAL

Presentada por:

Bachiller: ROGER ARÍSTIDES BUENO CABRERA

Asesor:

Dr. SEVERINO TORREL PAJARES

Cajamarca – Perú

2016

COPYRIGHT © 2016 by
ROGER ARÍSTIDES BUENO CABRERA
Todos los derechos reservados

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSGRADO



UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

TESIS APROBADA:

EFICACIA DE TRICLABENDAZOL MÁS IVERMECTINA SOBRE *Fasciola hepatica* EN BOVINOS HOLSTEIN FRIESIAN

Para optar el Grado Académico de

MAESTRO EN CIENCIAS

MENCIÓN: SALUD ANIMAL

Presentada por:

Bachiller: ROGER ARÍSTIDES BUENO CABRERA

JURADO EVALUADOR

Dr. Severino Torrel Pajares
Asesor

Mg. Adolfo Irazábal Lector
Jurado Evaluador

Mg. Juan de Dios Rojas Moncada
Jurado Evaluador

M.Cs. Carlos Amorós Delgado
Jurado Evaluador

Cajamarca - Perú

2016



Universidad Nacional de Cajamarca

Escuela de Posgrado

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

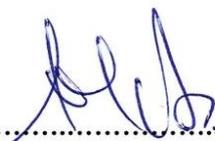
Siendo las *once* de la mañana del día 09 de diciembre de Dos Mil Dieciséis, reunidos en el Auditorio de la Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, el Comité Científico Evaluador presidido por el **Mg. ADOLFO IRAZÁBAL LECTOR**, en Representación del Director de la Escuela de Posgrado y como Miembro del Comité Científico, **Dr. SEVERINO TORREL PAJARES**, en calidad de Asesor, **Mg. JUAN DE DIOS ROJAS MONCADA**, **M.Cs. CARLOS AMORÓS DELGADO.**, como integrantes del Comité Científico. Actuando de conformidad con el Reglamento Interno y el Reglamento de Tesis de Maestría de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, se dio inicio a la Sustentación de la Tesis titulada “**EFICACIA DE TRICLABENDAZOL MÁS IVERMECTINA SOBRE *Fasciola hepática* EN BOVINOS HOLSTEIN FRIESIAN**”, presentada por Med. Veterinario. **ROGER ARÍSTIDES BUENO CABRERA**, con la finalidad de optar el Grado Académico de **MAESTRO EN CIENCIAS**, de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Mención en **SALUD ANIMAL**.

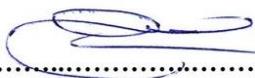
Realizada la exposición de la Tesis y absueltas las preguntas formuladas por el Comité Científico, y luego de la deliberación, se acordó *Aprobar* con la calificación de *A.B. Dieciséis (con grandes honores)* la mencionada Tesis; en tal virtud, Med. Veterinario **ROGER ARÍSTIDES BUENO CABRERA**, está apto para recibir en ceremonia especial el Diploma que lo acredita como **MAESTRO EN CIENCIAS**, de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Mención en **SALUD ANIMAL**.

Siendo las *12:10pm* horas del mismo día, se dio por concluido el acto.


.....
Mg. Adolfo Irazábal Lector
Miembro de Comité Científico


.....
Dr. Severino Torrel Pajares
Asesor


.....
Mg. Juan De Dios Rojas Moncada
Miembro de Comité Científico


.....
M.Cs. Carlos Amorós Delgado
Miembro de Comité Científico

A:

A mis padres y hermanos, a mi compañera y mis hijos que le dan sentido a mi vida, y también a ti, mi pequeño ángel, que me acompañas desde el cielo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida, sabiduría, fuerza y perseverancia para conducirme con rectitud en mi vida profesional.

Al Dr. Teófilo Torrel Pajares, por su amistad, dedicación y orientación para poder terminar el presente trabajo de investigación.

Al Ing. Francisco Arribasplata Díaz y Sra Manuelita Arrieta, propietarios del fundo San Francisco, por permitirme realizar esta investigación en sus bovinos.

A mi hermano Herman por su gran apoyo incondicional, cada vez que recurrí a su conocimiento y experiencia.

Mi gratitud sincera a mi amigo Víctor León Crisólogo, por su valioso apoyo.

Todos los días Dios nos da un momento en que es posible cambiar todo lo que nos hace infelices. El instante mágico es el momento en que un sí o un no pueden cambiar toda nuestra existencia.

- Coelho.

CONTENIDO

Ítem	Página
AGRADECIMIENTOS.....	vi
LISTA DE ILUSTRACIONES.....	ix
LISTA DE ABREVIACIONES.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
CAPITULO I: INTRODUCCIÒN.....	1
CAPITULO II: MARCO TEÒRICO.....	3
Antecedentes de estudio.....	3
Base Teórica.....	4
<i>Fasciola hepatica</i>	4
Triclabendazol.....	8
Ivermectina.....	11
Resistencia a los antihelmínticos.....	15
Glicoproteína P.....	22
CAPITULO III: CONTRASTACION DE HIPÒTESIS.....	30
Hipótesis.....	30
Tipo de Investigación.....	30
Ubicación.....	30
Materiales.....	30
Población y Muestra.....	31
Metodología.....	31
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÒN.....	34
CAPITULO V: CONCLUSIONES.....	40
LISTA DE REFERENCIAS.....	41
ANEXOS.....	51

LISTA DE ILUSTRACIONES

Tablas	Pág.
Marco Teórico	
01. Dosis terapéutica y vía de administración de los antihelmínticos.....	32
Resultados y Discusión	
01. Resultados de eficacia.....	34
02. Incremento de eficacia con respecto al grupo TCBZ.....	36
03. Incremento de eficacia con respecto al grupo TCBZ mas IVM oral.....	37
Anexos.	
Formación de grupos experimentales.	
01. Grupo Control.....	51
02. Grupo TCBZ.....	52
03. Grupo TCBZ más IVM oral.....	52
04. Grupo TCBZ más IVM SC.....	52
Análisis de Varianza.	
05. ANAVA para HPG inicial.....	52
06. ANAVA para edad de los animales.....	52
Registro de resultados de laboratorio pre y post dosificación, peso vivo y dosis terapéutica de cada fármaco.	
07. Grupo Control.....	54
08. Grupo TCBZ.....	55
09. Grupo TCBZ más IVM oral.....	56
10. Grupo TCBZ más IVM SC.....	57
Figuras.	
Marco Teórico.	
01. Representación esquemática de la Glicoproteína P.....	24
02. Función de la Glicoproteína P.....	24
03. Concentración de TBCZ en aislados resistentes de <i>Fasciola hepatica</i> y efecto de la combinación del TCBZ con IVM.....	29
Resultados y Discusión.	
01. Reducción de huevos pos dosificación.....	35
02. Eficacia de los tratamientos.....	36
03. Incremento de eficacia con respecto al grupo TCBZ.....	37
04. Incremento de eficacia con respecto al grupo TCBZ mas IVM oral.....	38

Anexos.

01.	Fundo San Francisco de Chumbil.....	51
02.	Material biológico.....	54
03.	Recolección de muestra de heces.....	58
04.	Estimación del peso vivo.....	59
05.	Administración de IVM subcutánea.....	61
06.	Administración de TCBZ vía oral.....	63

LISTA DE ABREVIACIONES

- TCBZ: triclabendazol.
- TCBZSO: triclabendazol sulfóxido.
- IVM: ivermectina.
- BZD: bencimidazoles.
- BZD-R: bencimidazol resistente.
- BZD-S: bencimidazol sensible.
- ATP: adenosin trifostato.
- Gp-P: glicoproteína P.
- W.A.A.V.P: world association for the advancement of veterinary parasitology.
- Kg pv: kilogramos de peso vivo.
- I.C.: intervalo de confianza.
- ANAVA: análisis de varianza.
- HPG: huevos por gramo de heces.
- kDa: kilodalton.
- ng: nanogramo.
- µg: microgramo.
- mdr: resistencia a múltiples drogas.

RESUMEN

La eficacia de triclabendazol ha disminuido en los últimos años, debido a su uso frecuente e inadecuado, dificultando el control de *Fasciola hepatica* en los animales domésticos. Se conoce que la ivermectina administrada conjuntamente con triclabendazol y con la intervención de la proteína transportadora glicoproteína P, incrementa la biodisponibilidad de triclabendazol aumentando su eficacia. El presente trabajo evaluó este efecto administrando ivermectina vía oral y parenteral. El estudio se realizó entre los meses de mayo y julio del año 2013, en el predio San Francisco del distrito Tumbadén de la provincia de San Pablo, Cajamarca. Se utilizaron 60 bovinos hembras de la raza Holstein Friesian naturalmente infectados, en cuatro tratamientos de 15 bovinos cada uno. Se realizó el test de reducción de conteo de huevos (T.R.C.H) mediante el método de sedimentación natural cuantificada, tomando la muestra a los 28 días pos tratamiento. Se obtuvo para triclabendazol una eficacia de $51,75 \pm 8,19\%$, para triclabendazol más ivermectina oral una eficacia de $56,64 \pm 8,12\%$, no habiendo diferencia estadística entre ambos resultados; en tanto que para triclabendazol más ivermectina subcutánea se obtuvo una eficacia de $69,93 \pm 7,52\%$, la cual si es significativamente diferente a los resultados mencionados anteriormente (nivel de confianza 95%). La eficacia de triclabendazol se incrementa solamente en 9,43% cuando se administra con ivermectina oral. La eficacia de triclabendazol más ivermectina sub cutánea, se incrementa en 23,46% con respecto a la eficacia de triclabendazol más ivermectina oral y 35,10% sobre la eficacia de triclabendazol.

Palabras clave: bovinos, *Fasciola hepatica*, triclabendazol, ivermectina, glicoproteína P, eficacia, Cajamarca.

ABSTRACT

The efficacy of tricloabendazole has declined in recent years due to their frequent and inappropriate use, difficult to control and prevention of *Fasciola hepatica* in animals. It is known that ivermectin administered with tricloabendazole and with the intervention of the carrier protein P-glycoprotein, increases the bioavailability of increasing efficiency tricloabendazole. This study evaluated the effect ivermectin administered orally and parenterally. The study was conducted between May and July 2013, on the campus of San Francisco Tumbadén district of the province of San Pablo, Cajamarca. Sixty naturally-infected female Holstein Friesian cattle were used in four treatments of 15 cattle each. Fecal egg count reduction test (F.E.R.C.T.) was performed by the method of quantified natural sedimentation, taking the sample at 28 days pos treatment. tricloabendazole was obtained for an efficiency of $51,75 \pm 8,19\%$ for more tricloabendazole oral ivermectin efficacy of $56,64 \pm 8,12\%$, with no statistical deference between the two results, to tricloabendazole more sub cutaneous ivermectin efficacy of $69,93 \pm 7,52\%$ was obtained, the which if it is significantly different from previous results (95% confidence level). The efficacy of tricloabendazole is only increased by 9,43% when administered with oral ivermectin. tricloabendazole more effective ivermectin sub cutaneous, increases 23,46% compared to the effectiveness of oral ivermectin triclebendazol more and 35,10% on the effectiveness of tricloabendazole.

Keywords: cattle, *Fasciola hepatica*, tricloabendazole, ivermectin, glycoprotein P, efficiency, Cajamarca.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Fasciola hepatica es el parásito causante de la fasciolosis bovina, considerada en el mundo como una de las enfermedades parasitarias más importantes de los rumiantes domésticos. Las alteraciones estructurales y metabólicas que produce, son factores limitantes de la producción ganadera. Las pérdidas directas por decomisos de hígados son cuantiosas, aunque la mayor frecuencia de la forma subclínica hace que las pérdidas indirectas sean superiores, no obstante, son más difíciles de cuantificar y se refieren a la reducción de los índices de crecimiento, conversión alimenticia, a la disminución de la producción láctea y cárnica, a interferencias en la fertilidad y fecundidad, a la mayor receptividad frente a otras infecciones, así como costosos tratamientos terapéuticos (Cordero et al, 1999).

Cajamarca cuenta con una población de 661 400 vacunos y es la región más importante del país en cuanto a producción de carne de vacuno al producir 29,6 mil toneladas durante el 2011 lo que representa 16, 6% del total nacional. En cuanto a la producción de leche, es la tercera cuenca lechera más importante del país, con 133 500 vacas en ordeño siendo la mayor población de vacas en producción por región (INEI, 2013). Sin embargo, la fasciolosis es una de las principales enfermedades, constituyéndose en un importante problema sanitario, se estima en los centros de beneficio una prevalencia de fasciolosis Bovina de 56,70% en la Región y de 80,8% en la provincia de Cajamarca, con elevadas pérdidas económicas por decomisos de hígados (Rojas y Palacios, 2009).

Ante este problema se utiliza fármacos fasciolicidas, como el principal medio de control, siendo el triclabendazol, el de mayor uso en la última década, debido a su eficacia frente a fasciolas de diferentes edades, a la oferta masiva de productos comerciales en variadas presentaciones, diferentes porcentajes de concentración con indicaciones similares, y a precios bastante económicos. Esto, aunado al uso sin criterio técnico, por parte de ganaderos sanitarios, técnicos agropecuarios, y profesionales afines, ha contribuido a la disminución de su eficacia. En un estudio

realizado en el predio Santa Elvira de la Sociedad Agrícola de Interés Social (SAIS) José Carlos Mariátegui, se encontró una eficacia de 77% (Palomino y Rojas, 2011), este resultado está por debajo de la eficacia aceptada para triclabendazol que debe ser mayor al 95% para realizar un efectivo control del parásito (Kassai, 2002).

Se ha demostrado *in vitro* que la ivermectina influye sobre la actividad de triclabendazol y de su metabolito principal sobre *Fasciola hepatica*, llegando a mejorar su eficacia hasta en 60%, tal como se ha comprobado en experiencias con cepas resistentes. Probablemente este sea un camino que ayudará a ir reduciendo la incidencia del fenómeno de resistencia a los antiparasitarios y del triclabendazol en particular. (Mottier et al. 2006). Por tal motivo el presente estudio se propuso determinar la eficacia de triclabendazol más ivermectina sobre *Fasciola hepatica*, en bovinos hembras de la raza Holstein Friesian, del fundo San Francisco del distrito Tumbadén, provincia de San Pablo, Cajamarca, para lo cual se planteó los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Determinar la eficacia de triclabendazol oral mediante el test de reducción de conteo de huevos.
- ✓ Determinar la eficacia de triclabendazol oral más ivermectina oral mediante el test de reducción de conteo de huevos
- ✓ Determinar la eficacia de triclabendazol oral más ivermectina subcutánea mediante el test de reducción de conteo de huevos.
- ✓ Analizar la eficacia de triclabendazol, triclabendazol más ivermectina oral y triclabendazol más ivermectina subcutánea.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del estudio.

En el distrito de Huerta de la provincia de Jauja región Junín, en el año 2009 se encontró una eficacia de 34,9% para triclabendazol a los 28 días pos dosificación, el estudio se realizó en 39 bovinos mediante la técnica de reducción del conteo de huevos (FECRT) (Chávez et al. 2012).

En Cajamarca se realizaron varios estudios para determinar la eficacia de triclabendazol mediante el test de reducción del conteo de huevos (T.R.C.H.) Así en el fundo Tartar de la Universidad Nacional de Cajamarca se obtuvo 2,8% de eficacia, el estudio se realizó en un total de 15 bovinos de diferente edad. (Rodas y Rojas, 2007). En el predio Quebrada Honda, distrito de Tumbadén, San Pablo, 81% de eficacia, en 15 bovinos Holstein hembras de diferente edad (Terán y Rojas, 2010). En el predio Santa Elvira de la Sociedad Agrícola de Interés Social (SAIS) José Carlos Mariátegui, se encontró 77% de eficacia, en 15 bovinos Holstein hembras, entre 13 y 31 meses de edad. (Palomino y Rojas, 2011).

En estudios recientes se ha concluido que la ivermectina tiene la capacidad de bloquear la Glicoproteína-P, incrementando la biodisponibilidad de los metabolitos de triclabendazol (TCBZ) en ovinos. Estudios *in vitro* han demostrado una interacción farmacocinética entre TCBZ e ivermectina (IVM), esta última, influye sobre la actividad del TCBZ y de su metabolito principal triclabendazol sulfóxido, llegando a mejorar su eficacia hasta en 60% tal como se ha comprobado en experiencias con cepas resistentes. Probablemente este sea un camino que ayudara a recuperar la eficacia del TCBZ (Mottier et al. 2006).

2.2. Base teórica.

2.2.1. *Fasciola hepatica*.

Es el trematodo más común del hígado, prevalente en áreas templadas y en regiones de gran altitud (Kassai, 2002), es el agente etiológico de la fasciolosis hepática, una de las parasitosis más importantes y difundidas del ganado bovino en todo el mundo, la cual se caracteriza por una inflamación del hígado y de los conductos biliares, con frecuencia de carácter crónico y acompañada de trastornos nutritivos (Cordero et al. 1999). También afecta a ovinos, caprinos, camélidos, cerdos, equinos, y aun al hombre (Rojas, 1990), y a muchas especies de animales salvajes (Blood y Radostits, 1992). Perteneciente al Phylum Platyhelminthes, Clase Trematoda, Sub clase Digenea, Familia Fasciolidae, Género *Fasciola*, Especie *hepatica* (Cordero et al. 1999).

- **Ciclo de vida.** Las fasciolas adultas se ubican en los conductos biliares del huésped, sus huevos descienden por dichos conductos y son excretados con las heces (Blood y Radostits, 1992). Una fasciola adulta pone entre 2 000 a 8 000 (Ueno y Gonçalves, 1998), incluso hasta 50 000 huevos/día (Quiroz, 2011). Los huevos en el agua (especialmente fuera de las heces) incuban entre tres a cuatro semanas dando lugar a una primera forma larvaria, el miracidio, que abandona el huevo por el opérculo y nada en busca del caracol hospedero del género *Lymnaea* (Blood y Radostits, 1992).

El miracidio mediante su espolón cefálico y sustancias líticas originan un agujero en la superficie de la cabeza o del pie del caracol, a través del cual inyecta un conjunto de células blásticas que se encuentran en el interior del miracidio; éstas se organizan en los tejidos del caracol, originando una cavidad que constituye la segunda forma larvaria, el esporocisto, en cuya pared interior se efectúa una primera reproducción asexual, dando lugar de cinco a ocho redias. Éstas, desarrollan, y a su vez en su interior, se realiza una segunda reproducción asexual llegando a formar 15 a 20 cercarias. Las cercarias rompen la redia, abandonan el caracol y mediante un flagelo nadan en búsqueda de una superficie de adherencia, que generalmente son las hojas de las hierbas del lugar, dando origen a la forma quística llamada

metacercaria. El desarrollo en el caracol se demora alrededor de seis a siete semanas (Rojas, 1990).

El desenquistamiento de las metacercarias tiene lugar en dos fases: la primera o de activación, acontece en el rumen y es activada por una alta concentración de dióxido de carbono, ambiente reductor y temperatura de 39 °C; la segunda o emergencia ocurre en el intestino delgado, por debajo de la desembocadura del conducto colédoco y es desencadenada por la bilis y el propio parásito. Tras el desenquistamiento, las jóvenes duelas atraviesan la pared intestinal, el parásito emigra por el parénquima hepático asentándose definitivamente en los conductos biliares a partir de los 40 días aproximadamente, donde alcanzan la madurez sexual. Los primeros huevos aparecen en las heces a partir de 55-56 días desde la ingestión de las metacercarias (Cordero et al. 1999).

- **Distribución.** *Fasciola hepatica*, es el trematodo más importante para los rumiantes domésticos, es la causa más común de enfermedad hepática en áreas templadas del mundo. En EE. UU, es endémica a lo largo del Golfo de México, la costa occidental, la región de las Montañas Rocosas y otras áreas. Se encuentra presente en el este de Canadá, Columbia Británica y Sur América y tiene importancia económica especial en las islas británicas, oeste y este de Europa, Australia y Nueva Zelanda. (Merck y Co. Inc. 2007).

En el Perú, está ampliamente distribuida, abarcando prácticamente todos los pisos altitudinales del país, aunque con mucha menor frecuencia en la selva baja. Se la encuentra por lo tanto en las regiones costa, yunga, quechua, suni, puna y selva alta, siendo notoriamente más frecuente en la región quechua, donde se puede encontrar hatos con variada tasa de infección, desde algunos casos hasta el 100%. Los márgenes de temperatura ambiental óptimos para el desarrollo del huevo están entre 10 y 30 °C. La temperatura crítica mínima es de 10 °C, por debajo de la cual tanto el caracol como las formas larvianas presentes en él, entran en un estado de diapausa o hibernación. La humedad también es importante en la estacionalidad y juntamente con la temperatura influyen en la dinámica

poblacional del caracol, que repercute en la producción de cercarias y obviamente en la de metacercarias (Rojas, 1990).

- **Fasciolosis.** La fasciolosis hepática aguda y crónica está producida por diferentes estadios de *Fasciola hepatica* en el hígado. La forma aguda se puede presentar a las cinco o seis semanas de haberse producido una ingesta de gran cantidad de metacercarias desencadenando una invasión rápida de fasciolas jóvenes en el hígado (Blood y Radostits, 1992), esto causa una destrucción del parénquima hepático dando lugar a una insuficiencia hepática aguda, a lo que hay añadir los efectos de la hemorragia de la cavidad peritoneal y disminución en la síntesis de albúmina. Las fasciolas inmaduras se alimentan de tejido hepático pero accidentalmente pueden ingerir una pequeña cantidad de sangre lo que produce una discreta anemia durante las cuatro a cinco semanas de la infección. La fasciolosis crónica se desarrolla lentamente debido a la actividad de las fasciolas adultas en los conductos biliares, éstas producen colangítis, obstrucción biliar, destrucción del tejido hepático, fibrosis y anemia (Blood y Radostits, 1992). Mediante el marcado de glóbulos rojos, con radioisótopos, se ha calculado la pérdida diaria por cada verme en aproximadamente 0,5–1mL de sangre (Cordero et al. 1999).

✓ **Síntomas clínicos.** Fundamentalmente depende de la cantidad y frecuencia de ingestión de metacercarias, siendo los síntomas más frecuentes inapetencia, anemia, pérdida de peso, menores índices productivos (Rojas, 1990). Los animales afectados se muestran poco vivaces e incluso, letárgicos, el edema submandibular y la ascitis no son características constantes (Cordero et al. 1999).

✓ **Diagnóstico.** El diagnóstico de la fasciolosis puede realizarse mediante la observación de la sintomatología, la utilización de técnicas específicas (biopatológicas, parasitológicas e inmunológicas) y los hallazgos de necropsia (Cordero et al. 1999); siendo el método más difundido el recuento de huevos en la materia fecal mediante la prueba de sedimentación (Nari y Fiel, 2001;

Kassai, 2002). Los datos obtenidos de un muestreo de materias fecales que sea representativo pueden ser expresados en forma cuantitativa (Nari y Fiel, 2001). El hallazgo de 100 a 200 huevos por gramo de heces en vacuno, indican una infección probablemente patógena, que requiere la aplicación de un fasciolicida (Cordero et al. 1999).

- ✓ **Tratamiento.** La terapia de la fasciolosis debe ir dirigida tanto contra las fasciolas adultas localizadas en los conductos biliares como contra las formas inmaduras en migración por el parénquima hepático con el fin de restaurar la función hepática. También para disminuir al máximo la contaminación de las pasturas con huevos que multiplicarán la infectividad del potrero con metacercarias. (Cordero et al. 1999). El uso de antihelmínticos es la práctica más común empleada por el productor para la lucha contra los parásitos; el objetivo es el de eliminar el agente causal de la enfermedad e interrumpir la excreción de los huevos con la materia fecal, para así prevenir la infección de los caracoles y la contaminación de las pasturas con metacercarias (Olaechea, 2004). Para tal fin existen productos como radoxanide, triclabendazol, clorsulón, closantel, nitroxinil entre otros (Blood y Radostits, 1992).

- ✓ **Prevención.** La fasciolosis por su amplia distribución entre los rumiantes domésticos y muchas especies silvestres es difícilmente erradicable, pero sí puede controlarse combinando los tratamientos antihelmínticos con medidas higiénicas y el control del pastoreo. La forma más importante y generalizada de profilaxis en todo el mundo es la aplicación estratégica de fasciolicidas que eliminan los parásitos de los animales infectados y que también contribuye a la reducción de la contaminación de los pastos. La elección del fármaco, aparte de consideraciones económicas, debe basarse en el conocimiento de su eficacia frente a las diferentes fases del desarrollo de *Fasciola hepatica* (Cordero et al. 1999).

El hospedador intermediario de la *Fasciola hepatica* es un caracol del género *Lymnaea* sp. de 5-8 mm de longitud y de 3-7 mm de ancho, la concha es cónica, puntiaguda y posee de 3-4 espiras bien marcadas. Se caracteriza por ser muy resistente a las condiciones medio ambientales. En épocas de lluvia desarrolla todo su potencial reproductivo, pero en las de sequía se entierra profundamente y allí puede sobrevivir por varios meses (Parra, 1996). El control no es fácil, por medios físicos se logra mejorando el drenaje, al reducir la humedad el hábitat de los caracoles cambia y mueren, el cercado de áreas pantanosas excluye los animales en pastoreo de zonas de caracoles. El empleo de productos químicos (molusquicidas) tiene el inconveniente de incrementar la contaminación ambiental, romper el equilibrio biológico, sin embargo, a pesar de ser costoso, es efectivo (Quiroz, 1995).

- ✓ **Importancia económica.** Las alteraciones estructurales y metabólicas que produce *Fasciola hepatica* son factor limitante de la producción ganadera. Las pérdidas directas por muertes o decomisos son cuantiosas para la industria cárnica, aunque la mayor frecuencia de la forma subclínica hace que las pérdidas indirectas sean superiores. No obstante, son más difíciles de cuantificar y se refieren a la reducción de los índices de crecimiento y conversión, a la disminución de la producción láctea y cárnica, a interferencias en la fertilidad y fecundidad, a la mayor receptividad frente a otras infecciones, así como costosos gastos terapéuticos (Cordero et al. 1999).

2.2.2. Triclabendazol.

- **Descripción.** Triclabendazol (TCBZ), es un antiparasitario activo contra parásitos maduros e inmaduros de las especies de fasciola. Pertenece a la familia química de los benzimidazoles (BZD), los cuales se caracterizan por su amplio espectro de actividad un margen grande de seguridad y un alto grado de eficacia (Merck y Co. Inc., 2007). Su denominación química

es 5-cloro-6 – (2,3, diclorofenoxi) –2-metil-tio-1H- benzimidazol y su fórmula es $C_{14} H_9 Cl_3 N_2 OS$.

- **Características fisicoquímicas.** Polvo cristalino de color blanco a ligeramente beige insoluble en agua; soluble en metanol y etanol y también soluble en grado variable en otros solventes orgánicos.
- **Farmacocinética.** Al igual que la mayoría de los BZD se administra por vía oral como suspensión, pasta o polvo. Las diferencias en la tasa y extensión de la absorción a partir del tracto gastrointestinal dependen de factores tales como la especie, la posología, la fórmula, la solubilidad y el funcionamiento del reflejo esofágico (Merck y Co. Inc. 2007).

La administración de TCBZ ocasiona una máxima concentración sanguínea de 15 partes por millón (ppm) entre 24 y 36 horas después de la aplicación declinando a 0,1 ppm en 10 días. Se alcanza un nivel estable en 48 horas y la curva de depleción tiene una vida media de 22 a 24 horas. Más del 95% de la dosis se elimina en las heces, aproximadamente dos por ciento en la orina y menos de uno por ciento en la leche (Sumano y Ocampo, 1997).

- **Farmacodinamia y mecanismo de acción.** En general, TCBZ es rápidamente metabolizado a su metabolito activo el triclabendazol sulfóxido (TCBZSO), no solo en el hígado del hospedador definitivo sino también en fracciones subcelulares del trematodo siendo este metabolito el que genera el efecto antiparasitario para posteriormente ser nuevamente sulfoxidado a la forma inactiva TCBZ sulfona eliminándose mayormente de esta forma (Mottier, et al. 2004).

Todos los BZD actúan sobre los parásitos interfiriendo su metabolismo generador de energía, la gran mayoría inhibiendo la enzima fumarato reductasa. El bloqueo del paso del fumarato reductasa inhibe la generación de la energía mitocondrial en la forma de Adenosin Trifosfato (ATP) (Booth y McDonald, 1987).

Triclabendazol, además de bloquear el fumarato reductasa, también se fija a la tubulina de los parásitos, lo que impide la unión de las subunidades de proteína alfa y beta de la tubulina y altera la función y estructura de los microtúbulos de las células de los parásitos. Los microtúbulos son estructuras intracelulares con varias funciones relacionadas con el movimiento de los cromosomas durante la división celular, la absorción de nutrientes, la motilidad y el soporte estructural de la célula, el movimiento de partículas intracelulares, la exocitosis y la comunicación intercelular (Márquez, 2007).

El efecto farmacológico de los antihelmínticos BZD requiere mayor período de latencia, siendo más lento que aquellos que actúan sobre la coordinación neuromuscular del parásito, e incluye déficit energético del parásito por disrupción de las células intestinales. Estas diferencias en el mecanismo de acción farmacológico determinan que la acción antihelmíntica *in vivo* de los BZD no sea inmediata. Se requieren concentraciones sostenidas en el tiempo para asegurar la eliminación de los parásitos de su sitio de localización, razón por la cual es relevante el conocimiento de las propiedades farmacocinéticas de los mismos (Mottier y Lanusse, 2001).

De acuerdo con esto, el efecto antiparasitario de triclabendazol es un proceso letal, pero relativamente lento (Merck y Co. Inc. 2007).

- **Dosis terapéutica.** La dosis terapéutica para vacunos es de 12 mg por cada kilogramo de peso vivo (mg/kg pv) (Blood y Radostits, 1992; Sumano y Ocampo, 1997; Cordero et al. 1999; Adams, 2003).
- **Toxicidad.** La dosis máxima tolerada es de 200 mg/kg pv El amplio margen de seguridad de los BZD se debe a su mayor afinidad selectiva por la tubulina parasitaria que por los tejidos de mamíferos (Merck y Co. Inc. 2007).

2.2.3. Ivermectina.

- **Descripción.** La estructura básica de las avermectinas, es un anillo lactona macrocíclico, de 16 elementos, siendo estructuralmente similares a los antibióticos macrólidos (Burg et al. 1979). Las avermectinas naturales, procedentes de la fermentación de *Streptomyces avermitilis*, se producen como una mezcla de ocho compuestos diferentes, que se denominan: A_{1a}, A_{1b}, A_{2a}, A_{2b}, B_{1a}, B_{1b}, B_{2a} y B_{2b} (Shoop et al. 1995; McKellar y Benchaqui, 1996). Las tres avermectinas naturales que se producen de forma mayoritaria son A_{2a}, B_{1a} y B_{2b}, El producto más potente y con mayor amplitud de espectro contra artrópodos es el B₁, seguido del B₂; sin embargo, el perfil de seguridad es superior para este último (Campbell et al. 1983).

Ivermectina (IVM) es una avermectina y es la primera lactona macrocíclica disponible comercialmente, y es la que se ha estudiado de manera más extensa (Merck y Co. Inc. 2007), está aprobada para el control de nematodos gastrointestinales, vermes pulmonares, piojos chupadores y cresas del ganado bovino. Fue introducida comercialmente en 1981 y es el miembro más antiguo y de mayor uso del grupo de las avermectinas disponibles como producto comercial, siendo un potente antihelmíntico con propiedades nematicidas e insecticidas (Campbell 1989; Brownlee et al. 1997).

- **Características fisicoquímicas.** Es un polvo blanquecino o amarillento, escasamente soluble en agua, pero soluble en glicol de propileno, glicol de polietileno y aceites vegetales es foto lábil en solución.
- **Farmacocinética.** El comportamiento farmacocinético de IVM se caracteriza por su larga persistencia en el organismo, su elevado volumen de distribución, el efecto significativo de la formulación, la ruta de administración y las grandes variaciones interespecíficas e intraespecíficas. A partir de estudios realizados en hombre, perro y ciervo se ha sugerido que la farmacocinética de la IVM es dosis-independiente, con concentraciones plasmáticas que se incrementan linealmente al aumentar la dosis (Andrew et al. 1993; McKellar y Benchaqui, 1996; McKellar, 1997).

IVM se absorbe bien tras su aplicación subcutánea, sin embargo, su velocidad de absorción desde el punto de aplicación está determinado por su formulación (Lo et al. 1985); un vehículo no acuoso enlentece la velocidad de absorción por precipitación en el lugar de inyección (Fisher y Mrozik, 1992; Scott y McKellar, 1992). Así, la administración subcutánea a dosis de 200 µg/kg pv resulta en una vida media biológica de ocho días debido a la lenta absorción en el sitio de aplicación. La concentración máxima en plasma de 44 ng/mL ocurre dos días después de la administración subcutánea. La eficacia clínica antihelmíntica persiste aproximadamente dos semanas después de la inyección subcutánea, dependiendo de la especie del parásito (Adams, 2003).

La biodisponibilidad sistémica tras administración oral está sujeta a diferencias interespecíficas y cabe señalar que los herbívoros presentan en general menor biodisponibilidad tras la administración oral que los carnívoros. Esto puede ser parcialmente atribuible a una mayor capacidad de metabolizar fármacos en el hígado, mayor efecto de primer paso y posiblemente por conversión metabólica por los microorganismos ruminales (Baggot y McKellar, 1994). Este último mecanismo fue el propuesto por Prichard y colaboradores en el año 1985. La conversión metabólica de los microorganismos en el rumen, inactiva la mayor cantidad del fármaco, tal es así que solo se absorbe 1/4 a 1/3 del total de la dosis administrada vía oral (Plumb, 2006). La biodisponibilidad relativa de la IVM administrada por vía oral, es un 36% respecto a la administración subcutánea, en la oveja (Marriner et al. 1987).

Aunque una carga parasitaria baja puede no interferir la absorción gastrointestinal, la existencia de parasitismo gastrointestinal normalmente afecta a dicho proceso y, en consecuencia, influye en la biodisponibilidad de los antihelmínticos por vía oral (Baggot y McKellar, 1994).

En vaca, cerdo, oveja y rata la IVM se concentra principalmente en hígado y grasa (Chiu et al. 1987). Los mayores niveles de residuos totales se localizan en hígado, bilis y grasa. La administración subcutánea origina

residuos mayores y más persistentes que la administración intrarruminal (Steel, 1993).

Tras administración subcutánea de IVM en oveja y vaca, no se detecta el fármaco en fluido abomasal y ruminal, pero si en el mucus abomasal y el mucus del intestino delgado (Bogan y McKellar, 1988). Este hecho es interesante ya que quizá por un mecanismo activo los endectocidas acceden a la luz del tracto digestivo, por lo que la administración subcutánea resulta útil en terapéutica. Los endectocidas, en general, sufren procesos de biotransformación que ocasionan hidroximetil-derivados y O-desmetil-derivados, eliminándose más del 50% de la dosis en forma no biotransformada. La IVM se biotransforma principalmente en tejido adiposo e hígado en distintas especies animales (buey, oveja, cerdo y rata), siendo el residuo mayoritario en hígado el fármaco inalterado (Chiu et al. 1987).

Los principales metabolitos hepáticos en buey, oveja y rata fueron el 24-hidroximetil H₂B_{1a} (22, 23 dihidroavermectina B_{1a}) y el 24-hidroximetil H₂B_{1b}, y en el cerdo el 3"-O-desmetil H₂B_{1a} y 3"-O-desmetil H₂B_{1b}. Alvinerie y sus colaboradores (1994), señalan la formación de 3"-O-desmetil metabolitos en cabra, oveja, cerdo, caballo, perro y conejo. En hígado de vaca estos metabolitos suponen un 23% a los 14 días de la administración, mientras el fármaco inalterado supone un 52% del total. En hígado de oveja los metabolitos representan el 20% a los 5 días de la administración y el 68% correspondió al fármaco inalterado (Steel, 1993).

La IVM se excreta fundamentalmente por vía biliar siendo la concentración en bilis y heces sustancialmente mayor que en plasma (Bogan y McKellar, 1988; Scott y McKellar, 1992). En vaca y oveja al menos el 98% de la dosis de IVM se excreta en heces independientemente de la vía de administración (Steel, 1993), y menos del 2% en la orina (McKellar y Benchaqui, 1996). El principal producto excretado en heces es el fármaco inalterado, que supone un 50% en vacas tratadas por vía subcutánea y casi el 70% del residuo fecal en ovejas tratadas intrarruminalmente (Steel,

1993). En caprino, un 89- 99% de la dosis se excreta en heces y menos del 1% en orina (Maynard et al, 1989).

- **Farmacodinamia y mecanismo de acción.** Las membranas de las células musculares somáticas, faríngeas, uterinas y sus neuronas asociadas de nematodos y artrópodos contienen canales iónicos selectivos al cloro. Estos canales están constituidos por cinco subunidades proteicas, de las cuales, tres subunidades alfa, beta y gamma forman combinaciones entre sí para formar un pentámero, siendo el glutamato el ligando natural en los canales iónicos, que vienen a ser los receptores conocidos como glutamato-cloro. Las avermectinas y las milbemicinas actúan como agonistas de elevada afinidad sobre la subunidad α de estos canales, de tal manera que, cuando los nematodos y artrópodos son expuestos a la acción de estos compuestos químicos, la motilidad, la fecundación y la capacidad de alimentación de estos parásitos se afecta. Estos compuestos químicos comparten el mismo mecanismo de acción, no obstante, las variaciones en las propiedades terapéuticas de estas moléculas, son el resultado de la forma farmacéutica y de las bondades propias de cada molécula. Si bien es probable que estos compuestos tengan más de un modo de acción, el mecanismo central es el de modular la actividad en los canales del ión cloro en las células nerviosas de los nematodos y en las células nerviosas y musculares de los artrópodos. Lo normal es que el glutamato se enlace en el receptor pos sináptico, provocando una apertura de los canales de cloro (Márquez, 2007).

Cuando estos fármacos se unen de manera selectiva e irreversible a los receptores, bloquean el glutamato y hacen que permanezcan abiertos los canales de cloro por acción del glutamato, como resultado los iones de cloro siguen fluyendo al interior de la célula nerviosa, lo que origina una hiperpolarización de la membrana de la célula muscular y/o neuronal, que trae como consecuencia el bloqueo de la neurotransmisión, produciendo una parálisis flácida del parásito y la inhibición de la ingestión de alimento por el bloqueo de la bomba faríngea, esto le impide mantenerse en el sitio natural donde se localiza y, entonces, el parásito es eliminado. En mamíferos, las avermectinas han mostrado tener actividad con el complejo

receptor gama amino butírico-canal de cloro (GABA/canal cloro), estimulando la liberación pre sináptica de GABA y potenciando su unión a su receptor, lo que produce una prolongada hiperpolarización de las neuronas. Las avermectinas también han mostrado actividad sobre el complejo receptor glicina/canal de cloro. Estos complejos están restringidos al sistema nervioso central en los mamíferos, por lo que, dadas las bajas concentraciones de avermectinas que se alcanzan en el sistema nervioso central, hacen que estas moléculas sean extremadamente seguras en mamíferos (Márquez, 2007).

- **Vías de administración y dosis terapéutica.** La IVM administrada por vía subcutánea es más efectiva que la vía oral en contra de ecto y endoparásitos en ovinos, bovinos y caprinos (Lespine et al. 2005). El desarrollo tecnológico de bolos de liberación sostenido para la administración de fármacos antihelmínticos, es considerado un importante avance en el control de nematodos endoparásitos de los rumiantes, bolos que se expanden al depositarse dentro del rumen, liberando el antihelmíntico en forma constante por un período de 135 a 180 días (McKellar y Benchaqui, 1996). La dosis es de 0,2 mg/kg pv vía oral y subcutánea (Plumb, 2006).
- **Seguridad.** Su uso en vacas en gestación es seguro, no se indica en vacas en producción (Plumb, 2006).

2.2.4. Resistencia a los antihelmínticos.

- **Definición.** La resistencia a los antihelmínticos se define como un aumento significativo en la capacidad que tiene una fracción de una población de vermes para tolerar dosis tóxicas de sustancias químicas que son letales para otras poblaciones de la misma especie (Márquez, 2007; Booth y McDonald, 1987); siendo la heredabilidad de la resistencia la característica más importante de este fenómeno (Kassai, 2002).

La resistencia puede ser intrínseca o adquirida. Un parásito que es naturalmente o innatamente insensible al efecto de un fármaco es intrínsecamente resistente, este fenómeno puede deberse a la falta del

receptor o a que la droga no puede entrar a la célula y así llegar a su sitio de acción, por ejemplo, los trematodos y cestodes son intrínsecamente resistentes a la acción de los fármacos endectocidas. La resistencia adquirida se da cuando poblaciones que son inicialmente susceptibles a la acción de un fármaco, dejan de serlo tras la ocurrencia de cambios genéticos heredables de generación en generación. La resistencia adquirida es percibida cuando un fármaco que es inicialmente efectivo para un fin terapéutico determinado deja de serlo (Mottier y Lanusse, 2001).

Los mecanismos que operan estas modificaciones genéticas en resistencia adquirida son:

- a. **Mutación**, donde el ácido desoxirribonucleico de una célula susceptible sufre una alteración que induce modificaciones en la producción o función normal de un componente celular, que es crucial para que el fármaco produzca su efecto farmacológico; la mutación va siempre acompañada de selección hacia la población mutante o resistente, entonces las generaciones próximas serán hijas de las resistentes;
 - b. **Amplificación génica**, existe una multiplicación exagerada de ciertos genes que inducen a la célula a sintetizar cantidades elevadas de un producto celular normal, de relevancia en la acción de un fármaco, lo que las convierte en resistentes a dicho fármaco, que en condiciones normales debería ser altamente efectivo.
 - c. **Transferencia génica**, un organismo susceptible adquiere de otro, material genético que induce resistencia hacia el efecto de un fármaco o grupo de fármacos (Mottier y Lanusse, 2001).
- **Clasificación**. Dependiendo de si la resistencia ocurre para una o más fármacos de igual o diferente modo de acción se presentan los siguientes tipos de resistencia:

- a. **Resistencia Paralela.** Se presenta cuando los individuos de una población resistente a una sustancia química son también resistentes a otro compuesto que tiene similar mecanismo de acción.
 - b. **Resistencia Cruzada.** Se presenta cuando involucra sustancias químicas de diferentes mecanismos de acción.
 - c. **Resistencia Múltiple.** Se presenta cuando los parásitos son resistentes a más de dos grupos de antihelmínticos diferentes. La misma es resultado de la selección independiente para cada grupo o como resultado de resistencia cruzada (Márquez, 2007).
- **Aspectos Bioquímicas de la Resistencia.** Las modificaciones genéticas que confieren resistencia se traducen en diferentes modificaciones bioquímico-moleculares que determinan la disminución del efecto de un fármaco en la célula u organismo resistente. Estas alteraciones moleculares representan las bases farmacológicas por el cual se genera el fenómeno de resistencia, y se pueden resumir tal como sigue:
 - 1) Cambios celulares estructurales y/o funcionales que modifican la captación (llegada) de un fármaco al sitio de acción o incrementan su metabolismo/inactivación y/o eflujo celular, afectando la capacidad del fármaco para acumularse intracelularmente;
 - 2) Alteración de sistemas enzimáticos necesarios para que se produzca el efecto del fármaco;
 - 3) Alteración de los receptores celulares, por disminución en el número o en su afinidad, lo cual afecta la unión del fármaco con su sitio de acción y, por lo tanto, su efecto farmacológico;
 - 4) Variaciones en diferentes procesos celulares que compensan o contrarrestan el efecto inducido por un fármaco ((Mottier y Lanusse, 2001).
 - **Desarrollo de la Resistencia.** La resistencia ocurre como un fenómeno pre adaptativo de los parásitos, en los cuales el gen o genes que confieren resistencia existen ya en un rango fenotípico de las especies, así, la introducción y el continuo uso de los antihelmínticos confieren cierta

ventaja de supervivencia a aquellos parásitos portadores de genes de resistencia.

El surgimiento y la velocidad de desarrollo de la resistencia es un fenómeno complejo que involucra factores internos (propios del parásito) y externos controlados por el ser humano. Dentro de los primeros se encuentran las características genéticas de los parásitos como el tipo de heredabilidad, dominancia, nivel de resistencia, habilidad biológica, potencial biótico, intervalo entre generaciones, estadio expuesto al fármaco y la proporción de la población en refugio. Los factores externos u operacionales tienen que ver con el mecanismo de acción de los fármacos, su grado de eficacia, frecuencia de tratamientos, dosis, rotaciones y formas de manejo de los animales (Márquez, 2007).

- **Detección de la resistencia antihelmíntica.** Se sospecha que en un rebaño hay resistencia cuando la respuesta clínica después de un tratamiento es baja; y antes de que la falla de un antihelmíntico sea detectada por los signos clínicos, la selección para resistencia ya ha ocurrido. Existen varias técnicas para detectar resistencia, pero la Prueba de Reducción de Huevos Fecales, es la más común, la cual provee una estimación de la eficacia antihelmíntica mediante la comparación de recuentos de huevos en heces de animales antes y después de los tratamientos (Márquez, 2007).
- **Control de la resistencia.** El control de la resistencia, para retardar su inicio o para disminuir su velocidad de desarrollo, está desarrollado indiscutiblemente con los métodos diseñados para el control de helmintos, los cuales están siendo enfocados cada vez más en mantener bajos los niveles de la población de parásitos que no afecten la producción de los rumiantes, y menos en eliminar los parásitos adultos de los huéspedes, siendo la adopción de medidas que reduzcan la frecuencia de los tratamientos el eje central de las recomendaciones.

A pesar de los importantes avances alcanzados en la caracterización molecular y genética poblacional de la resistencia de parásitos a la acción

de los fármacos antihelmínticos, tenemos aún muchas dificultades para proponer soluciones concretas, tendientes a frenar el desarrollo del fenómeno de resistencia en condiciones prácticas.

En general se pueden hacer las siguientes recomendaciones:

- Rotación de antihelmínticos con mecanismos de acción diferentes a intervalos de uno a dos años.
- Utilización mínima de antihelmínticos.
- Dosificación exacta de los animales basada en el peso individual.
- Tratamiento inmediato de animales recientemente adquiridos.
- Fomentar la cría de animales que han resultado ser genéticamente resistentes.
- Manejo del pastoreo.
- Diagnóstico adecuado.
- Control de calidad del fármaco.
- Medidas de cuarentena.
- Educar a los veterinarios de campo y ganaderos sobre la resistencia frente a los antihelmínticos y su control (Mottier y Lanusse, 2001; Márquez, 2007; Booth y McDonald, 1987).

- **Resistencia a fármacos bencimidazoles**

Recientes investigaciones parecen indicar que los compuestos BZD se unen tanto a la α tubulina como a la β tubulina, con estequiometría de 1:1, y a los polímeros α/β con una estequiometría 2:1. Los microtúbulos son estructuras intracelulares que poseen una amplia variedad de funciones celulares, entre ellas movimiento de cromosomas durante la división celular, soporte estructural de la célula, motilidad, movimiento de partículas intracelulares como metabolitos energéticos, absorción de nutrientes, exocitosis y comunicación célula-célula. La resistencia ocurre cuando los genes que codifican para β tubulina sufren mutaciones, lo cual causa la pérdida del receptor de alta afinidad por BZD. Esto se ve reflejado en una disminución en la unión específica de BZD a β tubulina. Han sido

identificados dos isotipos de β tubulina: isotipo uno e isotipo dos, los cuales corresponden a genes separados. En nematodos la resistencia a BZD ha sido asociada con cambios genéticos principalmente en el isotipo uno. Tres cambios de aminoácidos fueron observados en los isotipos uno de β -tubulina entre *Haemonchus contortus* susceptibles (BZD-S) y resistentes (BZD-R) a BZD, en la posición 76, donde fenilalanina (BZD-S) es reemplazada por valina (BZD-R), en la posición 200 donde fenilalanina (BZD-S) es reemplazada por tirosina (BZD-R) y 368 donde valina (BZD-R) reemplaza a isoleucina (BZD-S). Existe una correlación total entre la resistencia a BZD y la mutación en el isotipo uno de la β tubulina en la posición 200, donde fenilalanina (Fen) es reemplazada por tirosina (Tir) en los diferentes aislamientos de *H. contortus* y *T. colubriformis* resistentes a BZD. Este mismo cambio en la posición 200 también está presente en hongos como *Aspergillus nidulans* resistentes a BZD (Mottier y Lanusse, 2001).

Esta mutación en la posición 200 en ambos isotipos génicos (uno y dos) de β tubulina, causa la pérdida del sitio de unión de alta afinidad en *H. contortus* resistentes a BZD. El grado de resistencia depende de la acumulación de mutaciones como Fen 200 Tir y en otros codones en los isotipos génicos uno y dos de β tubulina o depende de esas mutaciones en el isotipo uno inicialmente (bajos a moderados niveles de resistencia), seguido por una pérdida del locus del isotipo dos (altos niveles de resistencia).

Recientemente se ha demostrado que las mutaciones en el codón 200 ó 167 de la β tubulina llevan a que se pierda la unión a BZD con el consecuente desarrollo de resistencia Debido a que la β tubulina de los mamíferos tiene también tirosina en la posición 200 es muy poco probable que la resistencia a BZD pueda ser resuelta realizando cambios en la química del fármaco. No sería posible diseñar un agente selectivamente tóxico contra los nematodos u hongos, porque la β tubulina de los mismos y del huésped animal tendrían una afinidad similar por las moléculas BZD, lo cual reduciría el adecuado margen terapéutico en los actuales fármacos BZD.

La selección para resistencia a BZD surge de la pérdida de susceptibilidad más que de la adquisición de un nuevo mecanismo molecular, puesto que se debe a una modificación de su sitio de acción (β tubulina). Se pierde el receptor de alta afinidad localizado en el extremo N terminal de dicha proteína, debido a que los genes que codifican para el mismo sufren mutaciones, que al expresarse representan un cambio aminocídico en la posición 200 del isotipo uno de β tubulina. Esto se ve reflejado en esa disminución de la unión específica de los BZD con la consecuente disminución de su efecto farmacológico (Mottier y Lanusse, 2001).

En cuanto a TCBZ se refiere, los mecanismos de resistencia son específicos para este fármaco, numerosos estudios aportan evidencias de que los sistemas enzimáticos de metabolización podrían estar alterados o sobreexpresados en los individuos de *F. hepatica* resistentes a TCBZ. En este punto se ha señalado que la flavin monooxigenasa y el citocromo P-450 son los responsables fundamentales de la metabolización del TCBZ en sus principales metabolitos activos (Mottier et al. 2004) y se ha demostrado que esta actividad metabólica es significativamente mayor en las cepas resistentes (Álvarez et al. 2005).

Otros procesos relacionados con la dinámica del fármaco en los tejidos parasitarios también pudieran contribuir al desarrollo de la resistencia. Así, se ha demostrado que mientras la absorción del TCBZ y el TCBZSO en las cepas resistentes es significativamente menor que en las susceptibles (Álvarez et al. 2005; Mottier et al. 2006), la absorción del albendazol es similar en ambos tipos (Mottier et al. 2006), este resultado sugiere que el mecanismo de resistencia es específico para el TCBZ, pudiendo estar implicada una proteína transportadora de membrana, la glicoproteína-P (Gp-P), que impediría a la molécula antiparasitaria alcanzar concentraciones activas en el lugar de acción. La sobreexpresión de la Gp-P se ha relacionado con el desarrollo de resistencias frente a diferentes clases de antihelmínticos (Prichard y Roulet, 2007)

2.2.5. Glicoproteína P (Gp-P)

En los últimos años, se ha estudiado la participación de diferentes transportadores celulares de membrana en los procesos de distribución tisular y excreción de compuestos farmacológicamente activos y/o sus metabolitos (Schinkel et al. 1995). De todos los transportadores celulares identificados, la Gp-P ha sido la más estudiada. Si bien la Gp-P fue inicialmente descrita por su sobreexpresión en células tumorales resistentes a múltiples fármacos anticancerígenos, también se localiza en células normales de tejidos involucrados en los procesos de absorción, distribución, y excreción de fármacos (Mealey et al. 2004). La localización específica en estos tejidos sugiere que la Gp-P cumpliría un importante rol en la regulación del transporte de fármacos, modificando de este modo el comportamiento cinético y la biodisponibilidad de los mismos (Schinkel, 1997).

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la Gp-P funciona como una bomba de eflujo que secreta en forma activa una gran cantidad de compuestos no relacionados, desde el interior de la célula hacia el espacio extracelular. A nivel intestinal, la Gp-P limita la absorción y difusión trans epitelial provocando modificaciones en la biodisponibilidad de fármacos administrados por vía oral. Esta glicoproteína, no solo se localiza en tejidos involucrados en los procesos de absorción, como en la superficie apical de los enterocitos, sino también en tejidos de órganos involucrados en la eliminación de fármacos como superficie canalicular de los hepatocitos y superficie apical de las células epiteliales del túbulo renal. También se encuentra en la superficie luminal de las células endoteliales del cerebro, barrera hematoencefálica, células del sistema hematopoyético, corteza y médula adrenal (Lin, 2003).

Debido a que la Gp-P presenta una amplia especificidad de sustratos, es posible que ocurran interacciones entre fármacos reconocidos como sustratos (inhibidores o inductores) cuando éstos son co-administrados (Levêque, 1995). La comprensión de este tipo de interacciones podría convertirse en una herramienta farmacológica útil para incrementar la disponibilidad sistémica de diversos fármacos, contribuyendo a mejorar su actividad farmacológica.

- **Estructura y función de la Glicoproteína-P.** La Gp-P pertenece a la superfamilia de las proteínas transportadoras ABC (ATP-Binding Cassette), especializadas en el transporte activo de sustancias a través de la membrana celular. Esta codificada por una subfamilia de genes de los que se reconocen tres isoformas: mdr I, II y III. Mientras que en humanos sólo se expresan las clases I y III (mdr 1 y mdr 3, respectivamente), (Lee et al. 1993). Las clases I y II codifican a proteínas transportadoras y confieren resistencia a múltiples fármacos; sin embargo, la clase III (mdr 3 de humanos) no está asociada al transporte de fármacos, sino que codifica a una traslocasa de la fosfatidilcolina localizada en la membrana de los canalículos biliares (Smith et al. 1993).

La Gp-P es un complejo glicoproteico de membrana de 1 280 aminoácidos con un peso molecular de 170 kDa. Está compuesta por dos mitades simétricas y homólogas que actúan en forma coordinada como una unidad (Figura 1). Cada mitad consta de seis dominios transmembrana y de un dominio de unión al ATP localizado en la superficie citosólica (Fardel et al. 1996). Si bien se ha determinado que ambos sitios de unión al ATP son necesarios para que la actividad de la Gp-P se produzca eficientemente, la interacción entre los sitios de unión al ATP y los dominios de unión a fármacos son esenciales para que se produzca la hidrólisis del ATP estimulada por el sustrato y el transporte del mismo (Figura 02). Mediante este mecanismo de transporte activo, los sustratos son secretados sin modificar fuera de la célula contra un gradiente de concentración, lo que provoca una disminución de su concentración intracelular (Ambudkar et al. 1999).

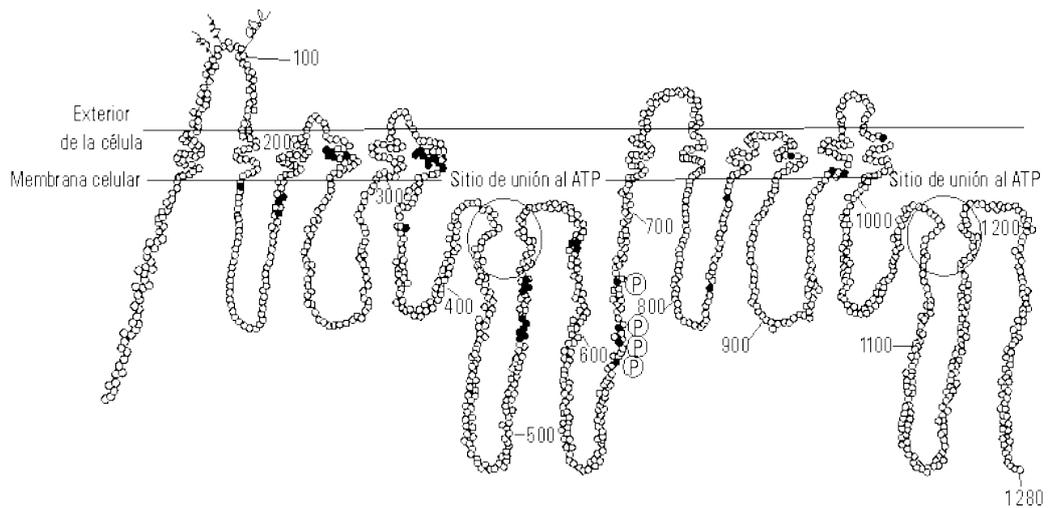


Figura 1. Representación esquemática de la Glicoproteína P. (Modificación de German, 1996).

Varios modelos han sido propuestos para explicar el mecanismo de excreción de fármacos mediado por Gp-P. El modelo del poro, el modelo de flipasa y el modelo de aspirador de moléculas hidrofóbicas han sido los principales modelos descritos. Este último ha sido el más aceptado y se caracteriza por el reconocimiento de sustratos localizados en la superficie interna y externa de la membrana plasmática y su transporte a través de canales proteicos (Higgins et al. 1992).

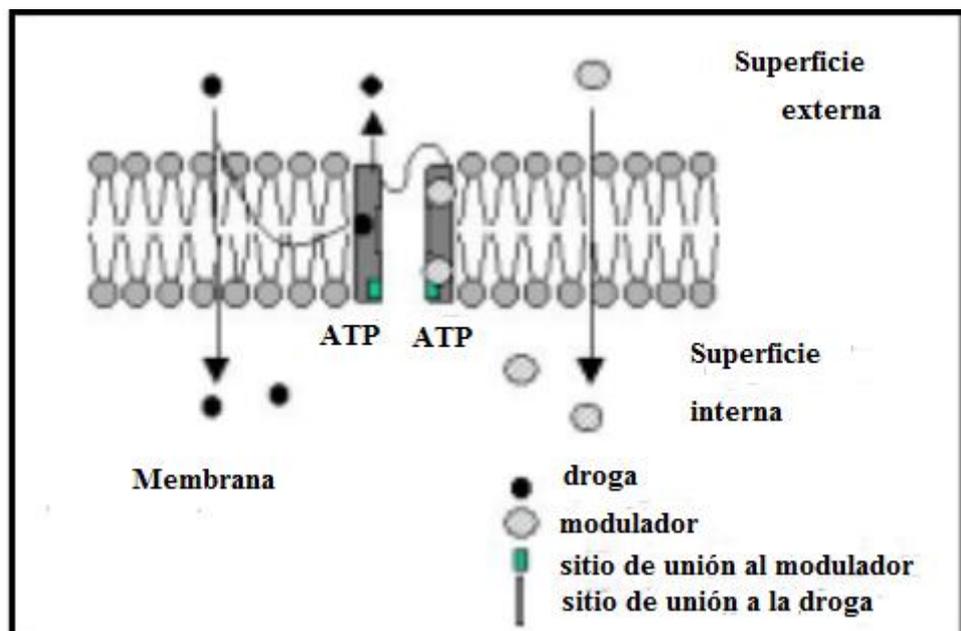


Figura 2. Función de la Gp-P. El modelo ilustra la actividad de la Gp-P, la que utiliza ATP para el transporte de sustratos a través de la membrana celular. Adaptado de Ford, 1995.

- **Localización de la Glicoproteína-P en tejidos normales.** Mediante la utilización de anticuerpos monoclonales y moléculas específicas para Gp-P en roedores y humanos se demostró que esta glicoproteína también se expresa en tejidos normales. La Gp-P se localiza en tejidos involucrados en los procesos de absorción (células epiteliales de intestino), distribución (barrera hematoencefálica) y eliminación de fármacos (superficie canalicular de los hepatocitos, superficie apical de las células epiteliales del túbulo renal y superficie apical de los enterocitos). También se encuentra en la superficie luminal de las células endoteliales del cerebro, células del sistema hematopoyético, corteza y médula adrenal (Lin, 2003).
- **Rol de la Glicoproteína-P en la disposición de fármacos.** La distribución de la Gp-P en el tracto gastrointestinal se incrementaría desde el duodeno hacia el colon, con picos de expresión en íleon y colon distal (Stephens et al. 2002). Esto concuerda con estudios *in vitro* realizados en intestino de rata donde la mayor actividad de Gp-P se observó en íleon, con menores niveles de actividad en el resto de los segmentos intestinales (Hunter y Hirts, 1997).

Se han descrito una gran cantidad de métodos *in vitro* que permiten caracterizar la actividad de la Gp-P en el transporte intestinal de fármacos. La línea celular Caco-2, derivada de adenocarcinoma de colon humano, ha sido ampliamente utilizada para caracterizar el modelo de barrera epitelial en la absorción intestinal de fármacos. El impacto de la Gp-P sobre la absorción de fármacos en monocultivos de Caco-2 ha sido demostrado mediante la determinación de la tasa de permeabilidad de un sustrato mediada por la Gp-P, donde la tasa de pasaje es mayor en dirección basolateral apical (correspondientes a la superficie serosa y lumen intestinal, respectivamente). La actividad de los transportadores celulares en el proceso de absorción de fármacos influye sobre la biodisponibilidad sistémica de los mismos y, por lo tanto, es determinante en la resultante eficacia clínica tras la administración oral de fármacos, así mismo juega un rol importante en la distribución de diferentes compuestos y en su comportamiento farmacológico/toxicológico de los mismos. La presencia

de Gp-P en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica limita la entrada al sistema nervioso central de numerosos fármacos como ivermectina, loperamida, dexametasona, digoxina, entre otros (Schinkel et al. 1995). La presencia de Gp-P en placenta constituye una importante barrera para el acceso de xenobióticos al feto (Lin, 2003).

La inhibición del transporte de fármacos a través del uso de un modulador puede ser el resultado de la inhibición del reconocimiento específico de un sustrato (Tamai y Safa, 1991), de la inhibición de la unión al ATP, de la inhibición de la hidrólisis del ATP (Ramanchandra et al. 1998), o la asociación de la hidrólisis de ATP a la traslocación de un sustrato. Muchos moduladores inhiben el transporte a través de mecanismos de inhibición competitiva y no competitiva (Garrigos et al. 1997). Ejemplos de esto son el verapamilo, que se une a los sitios de unión de la Gp-P inhibiendo el transporte de otros sustratos en forma competitiva, y la ciclosporina A, que interfiere tanto en el reconocimiento de sustratos como en la actividad cíclica (hidrólisis de ATP) de la Gp-P (Tsuruo et al. 1981).

- **Interacciones farmacocinéticas entre Glicoproteína-P y fármacos utilizados en medicina veterinaria.** Existen numerosos fármacos de uso en medicina veterinaria que son sustratos y/o inhibidores de diferentes transportadores celulares. En este contexto las modificaciones en la farmacocinética de estos sustratos de Gp-P que han sido documentadas en animales, pueden ser reproducidas cuando un efectivo inhibidor de Gp-P es co-administrado con un sustrato de dicho transportador. Dentro de las drogas antiparasitarias, que son ampliamente utilizadas en la terapéutica veterinaria, se presentan ejemplos muy interesantes de interacción farmacológica con transportadores celulares.

La interacción entre fármacos pertenecientes al grupo de las lactonas macrocíclicas (ivermectina, moxidectin) y la Gp-P ha sido documentada. Estudios *in vivo* utilizando ratones knockout para el gen *mdr1* revelaron una sensibilidad aumentada a IVM que se manifestó con signos de neurotoxicidad y muerte (Schinkel, 1997). A su vez, la IVM ha sido

descrita como un potente inhibidor de la Gp-P *in vitro* (Didier y Loor, 1996). Teniendo en cuenta estos antecedentes, y con los recientes avances de la biología molecular, pudo demostrarse la causa de la intolerancia de los perros de raza Collie a este tipo de fármacos. Existen subpoblaciones de Collies que desarrollan una sensibilidad a IVM comparable a la que se produce en ratones knockout para el gen *mdr1*. (Paul et al. 1987). La causa de esta sensibilidad se relaciona con una mutación (delección) del gen *mdr1*, que da como resultado una proteína no funcional (Roulet et al. 2003). Los perros homocigotas para la delección (mutación/mutación) experimentan efectos neurológicos adversos luego de una dosis única de IVM (100 µg/kg). A su vez, se ha demostrado que Collies sensibles pueden tener incrementada su susceptibilidad a otros fármacos endectocidas como milbemicina y moxidectin (Tranquilli et al. 1991).

La coadministración de verapamilo con IVM administrada por vía oral en ovinos, incrementó significativamente la absorción del antiparasitario. En corderos la co-administración de quercetina, un derivado flavonoide presente en vegetales, junto con moxidectin produjo un incremento en las concentraciones plasmáticas del antiparasitario (Dupuy et al. 2003).

Recientemente ha despertado gran interés el estudio de los posibles mecanismos mediados por transportadores celulares relacionados al fenómeno de resistencia antihelmíntica. La primera Gp-P de helmintos fue descrita a partir del nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* (Broeks et al. 1995), del que se han identificado al menos 14 Gp-P homólogas, y posteriormente en otros como *Onchocerca volvulus* (Kwa et al. 1998). Smith y Prichard en el año 2001, demostraron la asociación entre Gp-P de *H. contortus* y la resistencia a IVM y moxidectin. La transcripción del gen que codifica a la Gp-P estaría alterada en nematodos resistentes a fármacos endectocidas. Por otra parte, Xu, y sus colaboradores en el año 1998, demostraron que el ARNm de la Gp-P está presente en mayores cantidades en *H. contortus* resistentes a IVM comparado con los susceptibles, lo que estaría indicando una sobreexpresión de Gp-P en nematodos resistentes. La co-administración de fármacos endectocidas como IVM y moxidectin junto

con Verapamilo incrementó el porcentaje de eficacia contra *Haemonchus contortus* resistente a estas drogas en animales de laboratorio (Molento et al. 1999).

Si bien la interacción de los antihelmínticos benzimidazoles con estos transportadores celulares proteicos no está del todo aclarada (Merino et al. 2003), la posible participación de la Gp-P en los mecanismos de resistencia a estos fármacos ha sido sugerida (Beugnet et al. 1997).

- **Interacción farmacocinética entre Triclabendazol, Ivermectina y Glicoproteína P.** Existen varios mecanismos moleculares por los cuales se presenta resistencia de *Fasciola hepatica* al TCBZ. Entre ellos se encuentra: a) la lenta reducción de la oxidación del TCBZ a TCBZSO que es el metabolito activo, b) la unión del TCBZ a proteínas no específicas restringe la habilidad del fármaco a unirse al sitio de acción, y c) el eflujo mediado por transportadores donde se sobre expresa la acción de la Gp-P permitiendo la eliminación del fármaco desde las células (Álvarez et al. 2007). En estudios recientes se ha concluido que la IVM tiene la capacidad de inhibir la glicoproteína-P, incrementando la biodisponibilidad de los metabolitos del TCBZ en ovinos. Los resultados han demostrado in vitro una interacción farmacocinética, puesto que la IVM influye sobre la actividad del TCBZ y de su metabolito principal sobre *F. hepatica*, llegando a mejorar su eficacia hasta en 60%, tal como se ha comprobado en experiencias con cepas resistentes (Figura 03). (Mottier et al. 2006).

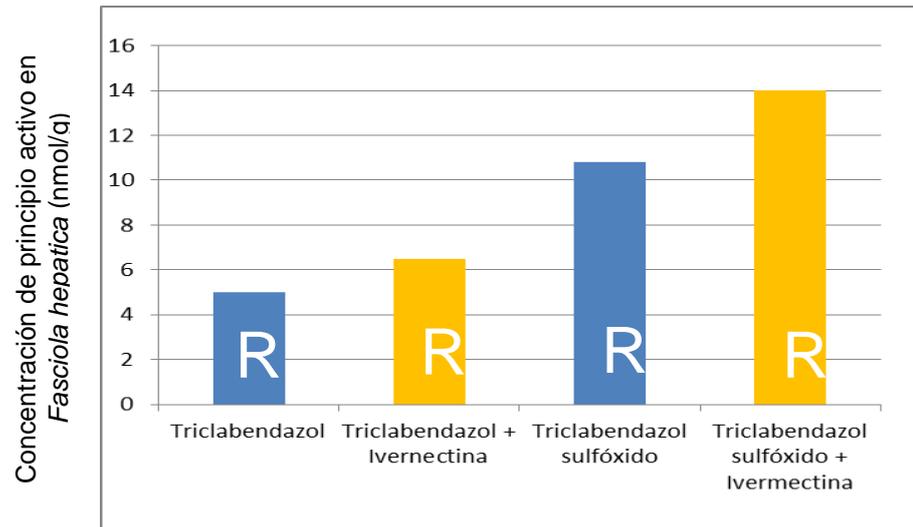


Figura 03. Concentración de TBCZ en aislados resistentes (R) de *Fasciola hepatica* y efecto de la combinación del TCBZ con IVM (Mottier et al. 2006).

CAPÍTULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS

3.1. Hipótesis

La eficacia de triclabendazol más ivermectina es mayor que la eficacia de triclabendazol sobre *Fasciola hepatica*, en bovinos de la raza Holstein Friesian, del fundo San Francisco del distrito Tumbadén, provincia de San Pablo, Cajamarca

3.2. Tipo de investigación.

La presente investigación es de tipo experimental, transversal, comparativa.

3.3. Ubicación.

La investigación se realizó en el fundo San Francisco del distrito Tumbadén, provincia de San Pablo, ubicado a 50 km al norte de la ciudad de Cajamarca. Sus características geográficas son 6° 57' 7" latitud sur, 78° 43' 50" longitud oeste, ubicado 3075 msnm, con una temperatura mínima promedio anual de 14 °C y una temperatura máxima anual de 20 °C (SENAMHI 2013). El trabajo de laboratorio fue realizado en el Laboratorio de Parasitología y Enfermedades Parasitarias de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Cajamarca. El trabajo se realizó los meses de mayo, junio y julio de 2013.

3.4. Materiales.

Material biológico. Se utilizaron 60 bovinos de la raza Holstein Friesian hembras, positivas a *Fasciola hepatica* y que no mostraron alguna enfermedad clínicamente detectable.

Material químico:

- Triclabendazol al 10%, suspensión de uso oral.
- Triclabendazol al 12%, más ivermectina al 0,2%, suspensión de uso oral.
- Ivermectina al 1%, solución inyectable de uso subcutáneo.

3.5. Población y muestra.

Población. El Fundo cuenta con un total de 270 bovinos de la raza Holstein Friesian, criados en forma extensiva, con el mismo régimen de alimentación y tenencia.

Muestra. Teniendo en cuenta la metodología propuesta por Ueno y Gonçalves en 1998, quien manifiesta que para realizar una prueba de eficacia para *Fasciola hepatica*, se debe contar con un mínimo de 15 unidades experimentales por tratamiento, el estudio se realizó con 60 animales hembras entre 10 y 32 meses de edad, naturalmente infectados, no tratados con fasciolicidas durante los últimos 60 días antes del inicio del estudio.

3.6. Metodología.

3.6.1. Actividades de campo. Se llevó a cabo tres visitas al predio:

Primera visita. Se realizó lo siguiente:

- **Identificación de los animales.** Se lo obtuvo del arete y de los registros del predio
- **Estimación del peso vivo.** Se determinó con cinta bovinométrica para la raza, midiendo el perímetro torácico.
- **Recolección de muestras de heces.** Se extrajo directamente del recto de cada animal aproximadamente 100 g de heces, en las primeras horas de la mañana.

Segunda visita. Se realizó la aplicación de los antiparasitarios (dosificación), esto fue después de cuatro días de la recolección de las muestras de heces y luego de obtener el resultado de la carga parasitaria (hpg pre dosificación).

Tercera visita. Se realizó al día 28 pos dosificación, para extraer las heces de cada animal en estudio, de forma similar al primer muestreo.

3.6.2. Trabajo de Escritorio. Se realizó las siguientes actividades:

- **Formación de grupos experimentales.** Luego de haber realizado la cuantificación de huevos por gramo de heces (hpg), se formó cuatro grupos experimentales de 15 animales cada uno, a los cuales se les asignó en forma aleatoria los diferentes tratamientos del estudio (Anexo 1. Tablas: 01, 02, 03, 04). Cada grupo experimental tuvo una sumatoria de hpg y edad similar entre ellos sin diferencias significativas (Anexo 1. Tablas: 05, 06).

- **Cálculo de dosis de los antihelmínticos.**

Se realizó multiplicando el peso vivo del animal por la dosis terapéutica de cada fármaco estudiado en mg/kg La cantidad del antiparasitario calculado para dosificar fue en mL para lo cual se aplicó una regla de tres simple, teniendo en cuenta la concentración de la base química de cada fármaco antiparasitario.

Tabla 01. Dosis terapéutica y vía de administración de los antihelmínticos.

Grupo Experimental	Nº de Animales	Dosis Terapéutica (mg/kg pv)	Vía de Administración
T ₀ Control	15
T ₁ Triclabendazol	15	12	Oral
T ₂ Triclabendazol + Ivermectina	15	12 0.2	Oral Oral
T ₃ Triclabendazol + Ivermectina	15	12 0,2	Oral Subcutánea

- **Registro de datos.** Se registró: Identificación de cada animal, peso vivo,

edad, huevos por gramo de heces (hpg) y dosis terapéutica. (Anexo 2. Tablas: 07, 08, 09, 10).

3.6.3. Trabajo de Laboratorio.

Para determinar la carga parasitaria se utilizó el Test de reducción del conteo de huevos (T.R.C.H.); para lo cual se empleó la técnica de Sedimentación Natural Modificada por Rojas y Torrel (Rojas, Torrel y Raico, 2013) (Anexo 3)

El primer recuento de huevos se realizó el día cuatro pre dosificación y el segundo el día 28 pos dosificación.

- **Cálculo del porcentaje de eficacia.** Se aplicó la fórmula de porcentaje de eficacia propuesta por la World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) para determinar la eficacia de cada tratamiento (Coles et al. 1992). (Anexo 4)
- **Análisis estadístico.** Se realizó la Prueba de Hipótesis para Diferencia de Proporciones (Daniel, 2004), con la finalidad de determinar las diferencias entre tratamientos medicados (Anexo 5).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 01. Eficacia de triclabendazol, triclabendazol más ivermectina oral, triclabendazol más ivermectina subcutánea, frente a *Fasciola hepatica* en bovinos de la raza Holstein Friesian, del fundo San Francisco de Chumbil provincia de San Pablo, Cajamarca, 2013.

Grupos Experimentales	Sumatoria huevos día 28	Promedio	Eficacia (%) + I.C.
T ₀ Control	143	9,53	0,00
T ₁ Triclabendazol	69	4,60	51,75±8,19 A
T ₂ Triclabendazol + Ivermectina Oral	62	4,13	56,64±8,12 A
T ₃ Triclabendazol + Ivermectina SC	43	2,87	69,93±7,52 B

Letras diferentes indica diferencia significativa entre tratamientos (prueba de Z). Nivel de significancia 0,05

Los resultados muestran que triclabendazol tiene una eficacia de 51,75%, así mismo 56,64 % para el triclabendazol más ivermectina oral y 69,93% para triclabendazol más ivermectina subcutánea (Tabla 01; Figura 02), es evidente el incremento de la eficacia de los tratamientos donde se usó ivermectina. Dichos incrementos se deben a la intervención de IVM, esta influye sobre la actividad de TCBZ y de su metabolito principal triclabendazol sulfóxido sobre *Fasciola hepatica*, tal como lo indican Mottier

y sus colaboradores, quienes en el año 2006 realizaron un estudio con cepas resistentes de *Fasciola hepática* al TCBZ, llegando a mejorar la eficacia hasta 60%.

Existen varios mecanismos moleculares por los cuales disminuye la eficacia de TCBZ frente a *Fasciola hepática*, entre ellos el eflujo mediado por transportadores donde se sobre expresa la acción de la Gp-P permitiendo la eliminación del fármaco desde las células encargadas del proceso de absorción del parásito (Álvarez et al. 2007). En nematodos resistentes se han detectado alteraciones en los niveles de expresión de los alelos para Gp-P. Se postuló así la posibilidad de que probables cambios genéticos en la expresión de Gp-P podrían estar relacionados con la resistencia a TCBZ en *Fasciola hepática* (Solana et al. 2011).

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la Gp-P funciona como una bomba de eflujo que secreta en forma activa una gran cantidad de compuestos no relacionados, desde el interior de la célula hacia el espacio extracelular. A nivel intestinal, la Gp-P limita la absorción y difusión trans epitelial provocando modificaciones en la biodisponibilidad de fármacos administrados por vía oral (Lin, 2003). En estudios recientes se ha concluido que la IVM tiene la capacidad de inhibir la Gp-P, incrementando la biodisponibilidad de los metabolitos del TCBZ (Didier et al. 1996; Mottier et al. 2006)

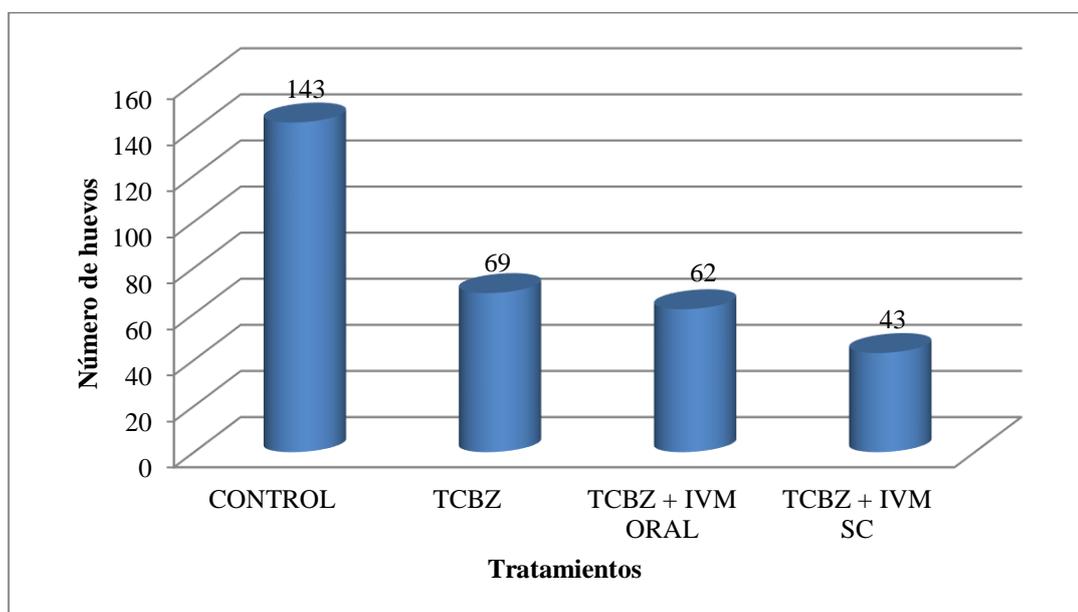


Figura 01. Reducción de huevos día 28 pos dosificación

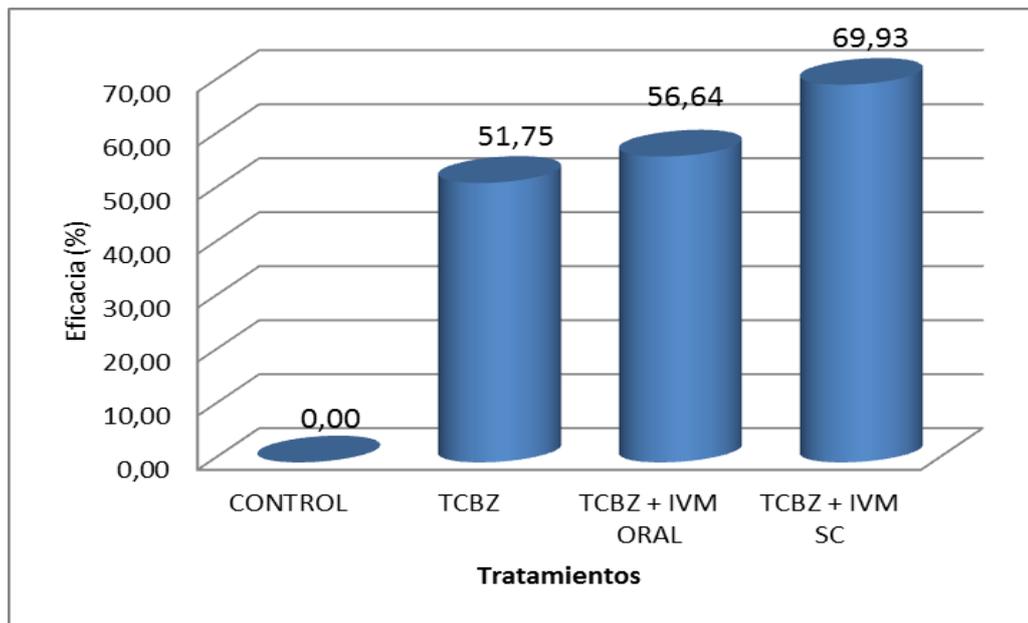


Figura 02. Eficacia de triclabendazol, triclabendazol más ivermectina oral, triclabendazol más ivermectina subcutánea

Tabla 02. Incremento de eficacia con respecto al grupo triclabendazol

Grupos Experimentales	Eficacia (%)	Incremento de Eficacia (%)
T ₁ Triclabendazol	51,75
T ₂ Triclabendazol + Ivermectina Oral	56,64	9,53
T ₃ Triclabendazol + Ivermectina SC	69,93	35,10

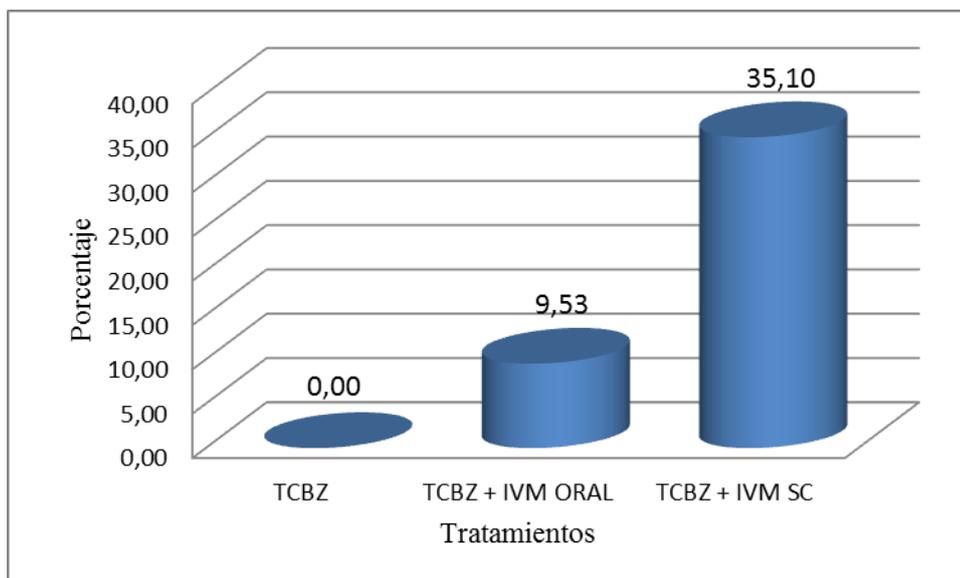


Figura 03. Incremento de eficacia con respecto al grupo triclabendazol

Tabla 03. Incremento de eficacia con respecto a triclabendazol màs ivermectina Oral

Grupos Experimentales	Eficacia (%)	Incremento de Eficacia (%)
T ₂ Triclabendazol + Ivermectina Oral	56,64	...
T ₃ Triclabendazol + Ivermectina SC	69,93	23,46

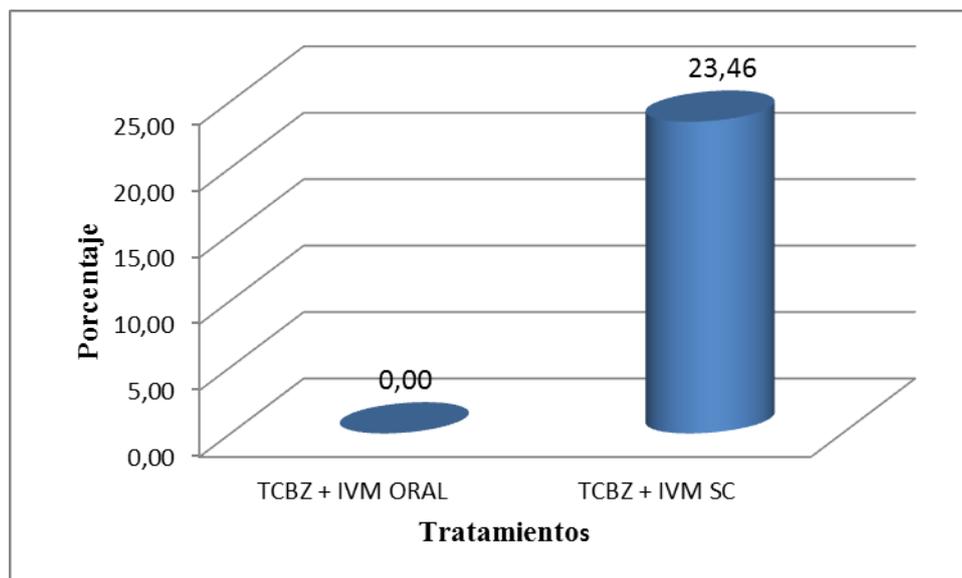


Figura 04. Incremento de eficacia con respecto al grupo triclabendazol más ivermectina oral

La eficacia obtenida en el presente trabajo para TCBZ oral más IVM SC (69,93%), tiene una diferencia significativa frente a la eficacia obtenida para TCBZ (51,75%), esta diferencia representa un incremento de 35,10% (Tabla 02; Figura 03). Así como también la eficacia obtenida para TCBZ más IVM SC (69,93%) es significativamente diferente a la eficacia obtenida para TCBZ más IVM oral (56,64%), esta diferencia representa un incremento de 23,46% (Tabla 03; Figura 04).

La administración subcutánea a dosis de 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pv resulta en una vida media biológica de ocho días debido a la lenta absorción en el sitio de aplicación. La concentración máxima en plasma de 44 ng/mL ocurre dos días después de la administración subcutánea. La eficacia clínica antihelmíntica persiste aproximadamente dos semanas después de la inyección subcutánea (Adams, 2003), el fármaco llega al mucus abomasal e intestinal (mas no al fluido ruminal) mediante un mecanismo de transporte activo a través de los enterocitos, para finalmente llegar a la luz intestinal en concentraciones terapéuticas (Bogan y McKellar, 1988).

Estos hechos, es decir la alta concentración de IVM en plasma y su paso a través de la mucosa intestinal, por un tiempo relativamente prolongado son suficientes para inhibir la acción de la Gp-P del parásito y del hospedador a nivel intestinal y permitir el paso de TCBZ, ya que este fármaco necesita entre 24 y 36 horas para alcanzar su

concentración máxima y 48 horas para alcanzar un nivel estable (Sumano y Ocampo, 1997), y teniendo en cuenta su mecanismo de acción, su efecto antihelmíntico no es inmediato, se requieren concentraciones sostenidas del fármaco en el tiempo para asegurar la eliminación de los parásito (Mottier y Lanusse, 2001), ya que el efecto antiparasitario de triclabendazol es un proceso letal, pero relativamente lento (Merck y Co. Inc. 2007).

De acuerdo con esto, la mayor concentración de IVM en el hospedero permite una mayor concentración en *Fasciola hepatica*, por lo tanto, una mayor inhibición de la Gp-P del trematodo, aumentando así la concentración del metabolito activo de TCBZ en el parásito aumentando su eficacia.

La eficacia de 56,64% obtenida para TCBZ más IVM oral, solo se incrementa en 9,45% con respecto a la eficacia obtenida para TCBZ (Tabla 02; Figura 03), esta diferencia no es significativa estadísticamente, Esto se debe a que los niveles de IVM que alcanzan la mucosa intestinal tras la administración oral, no son los suficientes para inhibir la acción de Gp-P, debido a la conversión metabólica de IVM por parte de los microorganismos ruminales (Baggot y McKellar, 1994; Prichard et al.1985). La conversión metabólica de los microorganismos en el rumen, inactiva la mayor cantidad del fármaco, tal es así que solo se absorbe 1/4 a 1/3 del total de la dosis administrada vía oral (Plumb, 2006). Por otro lado, la existencia de parasitismo gastrointestinal también influye negativamente en la biodisponibilidad de IVM por vía oral (Baggot y Mckellar, 1994).

CAPITULO V

CONCLUSIONES

1. La administración oral de triclabendazol más ivermectina subcutánea, incrementa significativamente en 35,10% la eficacia de triclabendazol sobre *Fasciola hepatica*, en vacunos de la raza Holstein Friesian, del fundo San Francisco de Chumbil provincia de San Pablo, Cajamarca.
2. La administración oral de triclabendazol más ivermectina subcutánea, incrementa significativamente en 23,46% la eficacia de triclabendazol más ivermectina oral sobre *Fasciola hepatica*, en vacunos de la raza Holstein Friesian, del fundo San Francisco de Chumbil provincia de San Pablo, Cajamarca.
3. La administración oral de triclabendazol más ivermectina oral, incrementa en 9,45% la eficacia de triclabendazol sobre *Fasciola hepatica*, en vacunos de la raza Holstein Friesian, del fundo San Francisco de Chumbil provincia de San Pablo, Cajamarca.

LISTA DE REFERENCIAS

Adams, H., 2003. Farmacología y Terapéutica Veterinaria. 2ª edición, Editorial Acribia S.A. Zaragoza-España. pp 1050-1075.

Álvarez, L.; Mottier, L.; Lanusse C., 2007. Drug transfer into target helminth parasites. Trends Parasitol 3: pp 97-104.

Álvarez, L.; Solana, H.; Mottier, L.; Virkel, G.; Fairweather, I.; Lanusse C., 2005. Altered drug influx/ efflux and enhanced activity in triclabendazole resistant liver flukes. Parasitology, **131**: pp 501-510.

Alvinerie, M.; Dupuy, J.; Eeckhoutte, C.; Sutra JF., 1999. Enhanced absorption of pour-on ivermectin formulation in rats by co-administration of the multidrug-resistant-reversing agent verapamil. Parasitology. Res.85, pp 920-922.

Alvinerie, M.; Tardieu, D.; Sutra, JF; Bojensen, G.; Galtier, P., 1994. Metabolic profile of ivermectin in goats: an in vivo and in vitro evaluation. In European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology. Proceedings of the 6th. International Congress. De. Lees, P. Edinburgh, 7-11 August, pp. 262. Blackwell Scientific Publications, Edinburgh.

Ambudkar, S.; Dey, S.; Hrycyna, C.; Ramanchandra, M.; Pastan, I.; Gottesman, M., 1999. Biochemical, cellular and pharmacological aspects of the multidrug transporter. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 39, pp 361-398

Andrew, S.; Ferrari, M.; Pow, J.; Lancaster, M., 1993. Nematode egg output and plasma concentration of ivermectin after its administration to red deer (*Cervus elaphus elaphus*). Vet. Rec., 132, pp 161-163.

Baggot, J.; Mckellar, Q., 1994. The absorption, distribution and elimination of antihelmintic drugs: the role of pharmacokinetics. J Vet. Pharmacol. Z'her. 17, pp 409-419.

Beugnet, F.; Gauthey, M.; Kerboeuf, D., 1997. Partial In vitro reversal of benzimidazole resistance by the free-living stages of *Haemonchus contortus* with verapamil. Vet Res. 141, pp 575-576.

- Blood, D.; Radostits M., 1992.** Medicina Veterinaria. 7ª Edición. México: Interamericana McGraw-Hill. Mexico. pp 110 -116.
- Bogan J.; McKellar Q., 1988.** The pharmacodynamics of ivermectin in sheep and cattle. *J Vet. Pharmacol. Z'her.* 11, pp 260-268.
- Booth, N.; McDonald L., 1987.** Farmacología y Terapéutica Veterinaria, 5ª Edición. Editorial Acribia S. A. Zaragoza – España. pp 141-143.
- Broeks, A.; Janssen, H.; Calafat, J.; Plasterk, A., 1995.** P-glycoprotein protects *Caenorabditis elegans* against toxins. *EMBO J.* 14, pp 1858-1866.
- Brownlee, D.; Holden-Dye, L.; Walker, R., 1997.** Actions of the anthelmintic ivermectin on the pharyngeal muscle of the parasitic nematode *ascaris suum*. *Parasitology* 115(5), pp 553-561.
- Burg, R.; Miller, B.; Baker, E.; Birnbaum, J.; Currie, S.; Hart-Man, R.; Kong, L.; Monahan, R.; Olson, G.; Putter, Y.; Tunac, J.; Wallick, H.; Stapley, E.; Oiwa, R.; Omura, S., 1979.** Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrob. Agents Ch.* 15, pp 361-367.
- Campbell, W.; Fisher, M.; Stapley, E.; Jacob, T., 1983.** Ivermectin: A potent new antiparasitic agent. *Science.* 221(4613), pp 823-828.
- Campbell, W., 1989.** Ivermectin and Abamectin. Springer-Verlag, New York. U.S.A.
- Chávez, A.; Sánchez, L.; Arana, C.; Suárez, F., 2012.** Resistencia a antihelmínticos y prevalencia de fasciolosis bovina en la ganadería lechera de Jauja, Perú. *Rev Invest. Vet Perú.* 23(1), pp 90-97.
- Chiu, S.; Taub, R.; Sestokas, E.; Lu, A.; Jacob, T.; 1987.** Comparative in vivo and in vitro metabolism of ivermectin in steers, sheep, swine and rat. *Drug Metab. Rev.* 18, pp 289- 302.
- Coles, G.; Bauer, C.; Borgsteede, F.; Geerts, S.; Klei, T.; Taylor, M.; Waller P., 1992.** World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 44, pp 35-44.

Cordero, M.; Rojo, F.; Martínez, A.; Sánchez, M.; Hernández, S.; Navarrete, I.; Diez, P.; Quiroz, H.; Carvalho, M., 1999. Parasitología Veterinaria. McGraw-Hill-Inteamericana. Madrid – España. pp 260 – 271.

Currie, S.; Hartman, R.; Kong, Y.; Monaghan, R.; Olson, G.; Putte, Y.; Tunac, J.; Wallick, H.; Stapley, E.; Oiwa, R.; Omura, S., 1979. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. Antimicrob. Agents Ch. 15, pp 361-367.

Daniel, W., 2004. Biostatística: Base para el análisis de las Ciencias de la Salud. 4^a edición. Limusa Wiley. México. pp 150-298.

Dantzig, A; Alwis, D.; Burgess, M., 2003. Considerations in the design and development of transport inhibitors as adjuncts to drug therapy. Adv DrugDeliv Rev. 55, pp 133-150.

Daurio, C.; Cheung, E.; Jeffcoat, A.; Skelly, B., 1992. Bioavailability of ivermectin administered orally to dogs. Vet. Res. Commun. 16, pp 125-130.

Didier, A.; Loor, F., 1996. The abamectin derivate ivermectin is a potent P-glycoprotein inhibitor. Anticancer Drugs. 7, pp 745-751.

Dupuy, J.; Larrieu, G.; Sutra J.; Lespine, A.; Alvinerie, M., 2003. Enhancement of moxidectin bioavailability in lamb by a natural flavonoid: quercetin. Vet. Parasitol. 4, pp 37-47.

Fardel, O.; Lecureur, V.; Guillouzo, A., 1996. The P-gly-coprotein multidrug transporter. Gen Pharmacol. 27, pp 1283-1291.

Fisher, M.; Mrozik, H., 1992. The chemistry and pharmacology of avermectins. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32, pp 537-553.

Ford, J., 1995. Modulators of multidrug resistance. Preclinical studies. Hematol OncolClin North Am. 9, pp 337-361.

Garrigos, M.; Mir, L.; Orlowski, S., 1991. Competitive and non-competitive inhibition of the multidrugresistance-associated P-glycoprotein ATPase- further experimental evidence for a multisite model. Eur J. Biochem. 244, pp 664-673.

German, U., 1996. P-glycoprotein: a mediator of multidrug resistance in tumour cell. Eur J. Cancer. 32A, pp 927-44.

Higgings, C.; Gottesman, M., 1992. Is the multidrug transporter a flippase? Trends Biochem Sci. 17, pp 18-21.

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S160991172012000100011&script=sci_arttext. Consultado el 12 diciembre del de junio 2013.

Hunter, J.; Hirst, B., 1997. Intestinal secretion of drugs. The role of P-glycoprotein and related drug efflux systems in limiting oral drug absorption. AdvDrug Deliv Rev. 25, pp 129-157.

Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI) 2013. Caracterización del Departamento de Cajamarca. www.bcrp.gob.pe/docs/sucursales/Trijillo/Cajamarca-caracterizacion.pdf Consultado el 24 de agosto del 2015.

Kassai, T., 2002. Helminología Veterinaria. Editorial Acribia S.A. Zaragoza-España. pp 183–192.

Kwa, M.; Okoli, M.; Schulz-Key, H.; Okongkwo. P.; Ross, M., 1998. Use of P-glycoprotein gene probes to investigate antihelminthic resistance in *Haemonchus contortus* and comparison with *Onchocerca volvulus*. Int J Parasitol. 28, pp 1235-1240.

Lanusse, C.; Prichard, R., 1993. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. Vet Parasitol 49, pp123-158.

Lee, C.; Bradley, G.; Zhang, J.; Ling, V., 1993. Differential expression of P-glycoprotein genes in primary rat hepatocyte culture. J Cell Physiol. 157, pp 392-402.

Lespine, A.; Alvinierie, M.; Sutra, I.; Pors, C., 2005. Influence of the route of administration on efficacy and tissue distribution of ivermectin in goat. Vet. Parasitol. 128 (3-4), pp 251-260.

Levêque, D.; Jehl, F., 1995. P-glycoprotein and pharmacokinetics. Anticancer Res. 15, pp 331-336.

- Lin, J., 2003.** Drug-drug interaction mediated by inhibition and induction of P-glycoprotein. *AdvDrug Deliv Rev.* 55, pp 53-81.
- Litter, M., 2007.** Compendio de Farmacología. 5ª Edición. Argentina: El Ateneo. pp 42.
- Lo, P.; Fink, D.; Williams J.; Blodinger, J., 1985.** Pharmacokinetic studies of ivermectin: effects of formulation. *Vet. Res. Commun.* 9, pp 251 -268.
- Márquez, D., 2007.** Resistencia a los Antihelmínticos. CORPOICA. Colombia: PRODUMEDIOS. pp 3-25.
- Marriner, S.; Mc kinnon, I.; Bogan, J., 1987.** The pharmacokinetics of ivermectin after oral and subcutaneous administration to sheep and horses. *1 Vet. Pharmacol. Ther.* 10, pp 175-179.
- Maynard, M.; Wislocki, P.; Ku, C., 1989.** Fate of Avermectin B1, in lactating goats. *1 Agr Food Chem.* 37, pp 1491-1497.
- McKellar, Q.; Benchaqui, H., 1996.** Avermectins and milbemycins. *J Vet. Pharmacol. Ther.* 19, pp 331-351.
- McKellar, Q., 1997.** Developments in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anthelmintic drugs. *1 Vet. Pharmacol. Ther.* 20, pp 10-12.
- Mealey, K., 2004.** Therapeutic implications of the mrd-1 gene. *J VetPharmacol Therap.* 27, pp 257-264.
- Merck y Co. Inc., 2007.** El Manual Merck de veterinaria. 6ª Edición. Editorial Océano. España. pp 2080-2095.
- Merino, G.; Molina, A.; García J.; Pulido, M.; Prieto, J.; Álvarez A., 2003.** Intestinal elimination of albendazole sulfoxide: pharmacokinetic effects of inhibitors. *Int J Pharm.* 16 (263), pp 123-32.
- Molento, M.; Prichard, R., 1999.** Effects of the multidrug-resistance-reversing agents verapamil and CL 347,099 on the efficacy of ivermectin or moxidectin against unselected and drug-selected strains of *Haemonchus contortus* in jirds (*Meriones unguiculatus*). *Parasitol Res.* 85, pp 1007-1011.

Montigny, P.; Shim, J.; Pivinichny, J., 1990. Liquid chromatographic determination of ivermectin in animal plasma with trifluoroacetic anhydride and N-methylimidazole as the derivatization reagent. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 8(6), pp 507-511.

Mottier, L.; Álvarez, L.; Fairweather, L.; Lanusse, C., 2006. Resistance induced changes in triclabendazole transport in *Fasciola hepatica*: ivermectin reversal effect. *Journal of Parasitology.* 92, pp1355-1360.

Mottier, L.; Lanusse, C., 2001. Bases moleculares de la resistencia a fármacos antihelmínticos. *Revista de Medicina Veterinaria,* 82(2), pp 74-85.

Mottier, L.; Virkel, G.; Solana, H.; Álvarez, L.; Salles, J.; Lanusse, C., 2004. Triclabendazole biotransformation and comparative diffusion of the parent drug and its oxidised metabolites into *Fasciola hepatica*. *Xenobiótico.* 34(11-12), 1043-1057.

Nari, A.; Fie,l C., 2001. Enfermedades Parasitarias de Importancia Económica en Bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención y control. Montevideo - Uruguay: Editorial Hemisferio Sur. pp 230-245.

Olaechea, F., 2004. Comunicación Técnica N° 449 Área producción animal - *Fasciola hepatica*; Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, argentina 2004. www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/parasitarias_bovinos/81-hidatidosis.pdf. Consultado el 18 de noviembre del 2013.

Palomino, G.; Rojas, J., 2011. Eficacia de cinco grupos químicos en el control de fasciolosis en ganado bovino del S.A.I.S. José Carlos Mariátegui, Huacraruco, distrito san Juan Cajamarca. Tesis para optar el Título Profesional, de Médico Veterinario, Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad Nacional de Cajamarca-Perú.

Parra, A., 1996. Epidemiología y control de la *Fasciola hepatica*. Curso-taller internacional, CORPOICA-CEISA. Santafé de Bogotá, Colombia. pp 8.

Paul, A.; Tranquilli, W.; Seward, R.; Todd, K.; Di Pietro, J., 1987. Clinical observations in collies given ivermectin orally. *Am J Vet Res.* 48, pp 684-685.

Plumb, D., 2006. Manual de Farmacología Veterinaria. 5ª edición. Editorial Interamericana. Buenos Aires-Argentina. pp 433-436.

Prichard, R.; Roulet, A., 2007. ABC transporters and tubulin in macrocyclic lactone resistance: prospects for marker development. *Parasitology*, 134, pp 1123-1132.

Prichard, R.; Steel, J.; Lacey, E.; Hennessy, D., 1985. Pharmacokinetics of ivermectin in sheep following intravenous, intra-abomasal or intraruminal administration. *J. Vet. Pharmacol.* 8, pp 88-94.

Quiroz, H., 1995. Impacto económico, epidemiología, control y prevención de *Fasciola hepatica* en la ganadería. XII Congreso Latino Americano de Parasitología, Santiago de Chile. 20.

Quiroz, H., 2011. Parasitología y Enfermedades Parasitarias de Animales Domésticos. Editorial LIMUSA. México. pp 246.

Ramanchandra, M.; Ambudkar, S.; Chen, D.; Hrycina, C.; Dey, S.; 1998. Human P-glycoprotein exhibits reduced affinity for substrates during a catalytic transition state. *Biochemistry*. 37, pp 10-19.

Rodas, C.; Rojas, J., 2007. Eficacia y resistencia antihelmíntica de nematodos gastroentéricos y *Fasciola hepatica* en vacunos *Holstein* en el fundo “Tartar-UNC”, campiña de Cajamarca; 2006. Tesis para optar el Título Profesional, de Médico Veterinario, Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad Nacional de Cajamarca. Cajamarca- Perú.

Rojas, M., 1990. Parasitismo de los Rumiantes Domésticos. Editorial MAIJOSA. Lima-Perú. pp 112-116.

Rojas, J.; Palacios, S., 2009. Impacto económico por decomiso de hígados infectados con *Fasciola hepatica* en camales de la Región Cajamarca, 2008. Informe final de trabajo de investigación, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Cajamarca, Perú. pp 14-16.

Rojas, J.; Torrel, S.; Raico, M., 2013. Validación de la técnica Sedimentación Natural modificada por Rojas y Torrel en el diagnóstico de fasciolosis crónica en bovinos, Cajamarca. Perú. Memorias de la XXIII ALPA de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal. La Habana, Cuba. PB288, pp 2424-2427.

Romero, P.; Rojas, J., 2000. Estudio comparativo de la efectividad de Closantel (Prosantel), Nitroxinil (Dovenix), Triclabendazol (Fasinex), en el tratamiento de Distomatosis Hepática en vacunos. Tesis para optar el Título Profesional, de Médico Veterinario, Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Cajamarca, Perú.

Roulet, A.; Puel, O.; Gesta, S.; Lepage, J.; Drag, M; Soll, M.; Alvinerie, M.; Pineau, T., 2003. MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. Eur J Pharmacol. 2-3, pp 85-91.

Schinkel, A.; Wagenaar, E.; Van Deemter, L.; Mol, C.; Borst, P., 1995. Absence of the mdr-1aP-glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin and cyclosporine A. J Clin Invest. 96, pp1698 -1705.

Schinkel, A., 1997. The physiological function of drugtransporting P-glycoproteins. Semin Cancer Biol. 8, pp 161-170.

Scott, E.; Mckella, Q., 1992. The distribution and some pharmacokinetic parameters of ivermectin in pigs. Vet. Res. Commun. 16, pp 139-146.

Shoop, W.; Mrozi, H.; Fisher, M., 1995. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. Vet. Parasitol., 59, pp 139-156.

Smith, J.; Schinkel, A.; Elferink, R.; Groen, A.; Wageraar, L.; Van Deemter, L.; Mol, C.; Ottendorf, R.; Van der Lugt, N.; Van Roon, M.; Van der Walk, M.; Offerhaus, G.; Berns, A.; Borst, P., 1993. Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and the liver disease. Cell 75, pp 451-462.

Smith, J.; Prichard, R., 2001. Localization of P-glycoprotein mRNA in the tissues of *Haemonchus Contortus* adult worms and its relative abundance In drug-selected and susceptible strains. J. Parasitol. 83 (3), pp 612-620.

Solana, H.; Scarcella, S.; Lamenza, P.; Tort, J.; Cerna, C.; Cabrera, M.; Rosales, C.; Ortiz, P., 2011. Expresión diferencial de Glicoproteína P en *Fasciola hepatica* proveniente de bovinos, ovinos y cerdos de Cajamarca, Perú. Sus implicancias en el desarrollo de resistencia antihelmíntica. XX Congreso Latinoamericano de

Parasitología y XV Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. Bogotá-Colombia. Biomédica 31(3), pp 370-371.

Steel, J., 1993. Pharmacokinetics and metabolism of avermectins in livestock. *Vet. Parasitol.* 48, pp 45-57.

Stephens, R.; Tanianis-Hughes, N.; Higgs, N.; Humphrey, M.; Warhust, G., 2002. Region-dependent modulation of intestinal permeability by drug efflux transporters: in vitro studies in *mdr1a* (-/-) mouse intestine. *J. Pharmacol Exp Ther.* 303, pp 1095-1101.

Strong, L., 1993. Overview: the impact of avermectins on pastureland ecology. *Vet. Parasitol.* 48(1-4), pp 3-17.

Sumano, H.; Ocampo, L., 1997. *Farmacología Veterinaria.* 2ª edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México. pp 495-498.

Tamai, I.; Safa, A., 1991. Azidopine noncompetitively interacts with vinblastine and cyclosporin A binding to P-glycoprotein in multidrug resistance cells. *J. Biol Chem.* 266, pp 796-800.

Terán, J.; Rojas, J., 2010. Determinación del grado de eficacia de Triclabendazol 12%, Closantel 10%, Nitroxinil 34% y Clorsulón 10%, en el control de fasciolosis hepática en bovinos del predio Quebrada Onda, distrito de Tumbadén. San Pablo, Cajamarca. Tesis para optar el Título Profesional, de Médico Veterinario, Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad Nacional de Cajamarca, Perú.

Tranquilli, W.; Paul, A.; Todd, K., 1991. Assessment of toxicosis induced by high-dose administration of milbemycin oxime in collies. *Am J vet Res.* 52, pp 1170-1172.

Tsuruo, T.; Iida H.; Tsukagoshi, S.; Sakurai, Y., 1981. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res.* 41, pp 1967-1972.

Ueno, H.; Gonçalves P., 1998. Manual para diagnóstico de los helmintos de Rumiante. 4ª Edición. Tokio-Japan: Japan Internacional Cooperation. Agency (JICA). 56, pp 130-131.

Xu, M.; Molento, M.; Blackhall, W.; Ribeiro P.; Beech, R.; Prichard, R., 1998. Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. *Mol Biochem Parasitol.* 91, pp 327-335.

Wayne, D., 2004. Bioestadística. 4ª Edición. Editorial LimusaWiley. México. pp 322-324.

West, G., 2005. Diccionario enciclopédico de Veterinaria. 16ª Edición. Editorial Iatros. Barcelona. pp 456.

ANEXOS

Anexo 1. Formación de los Grupos Experimentales.

Tabla 01. T₀ Grupo control.

N° de Animales	Identificación	HPG Día 0	Edad (meses)
1	Core	7	17
2	Noemia	3	25
3	Voce	7	21
4	Sabrosa	2	24
5	Ildiña	1	30
6	Perla	25	17
7	Juliana	28	15
8	Tostada	1	12
9	Lisha	2	19
10	Yau	11	18
11	Mas mas	1	30
12	América	3	13
13	Indra	11	11
14	Moneda	3	30
15	Agora	6	20
TOTAL		111	

Tabla 02. T₁ Grupo triclabendazol.

N° de Animales	Identificación	HPG Día 0	Edad (meses)
1	Pastusa	7	21
2	Josefa	9	17
3	Goya	3	28
4	Chinela	8	24
5	Tintica	2	30
6	Hermosa	1	32
7	Borgoña	14	12
8	Flecha	7	28
9	Denita	16	17
10	Ilusión	1	15
11	Celeste	3	21
12	Cherry QQ	16	20
13	Nieblita	4	11
14	Picasa	16	12
15	Damiana	3	28
Total		110	

Tabla 03. T₂ Grupo triclabendazol más ivermectina Oral.

N° de Animales	Identificación	HPG Día 0	Edad (meses)
1	Macu	8	17
2	Señorita	3	30
3	Kenko	8	23
4	Prata	1	20
5	Wasy	1	31
6	Jarrita	24	10
7	Chamame	23	12
8	Sureña	1	12
9	Moida	2	21
10	Nidia	14	20
11	Pacora	2	30
12	Yapada	11	16
13	Agenda	5	16
14	Chuva	7	24
15	Geladera	1	21
Total		111	

Tabla 04: T₃ Grupo triclabendazol más ivermectina subcutánea.

Nº de Animales	Identificación	HPG Día 0	Edad (meses)
1	Risota	1	30
2	Pilota 2	5	17
3	Abogada	2	29
4	Abelita	6	24
5	Lupe	1	25
6	Ricachona	1	30
7	Extra	42	15
8	Pilota 1	15	17
9	Ñiñe	1	12
10	Eleganre	2	22
11	Mavila	14	23
12	Cayajo	3	18
13	More	16	11
14	Maya	1	23
15	Panuda	1	23
Total		111	

Tabla 05. Análisis de varianza para hpg inicial.

ANAVA					
FUENTE DE VARIACION	GL	SC	CM	Fc	Ft
Tratamientos	3	0,05	0,017	0,000	2,78
Error Experimental	56	3 978,13	71,038		
TOTAL	59				

Este análisis comprueba que los tratamientos son homogéneos en cuanto hpg inicial.

Tabla 6. Análisis de varianza para edad.

ANVA					
FUENTE DE VARIACION	GL	SC	CM	Fc	Ft
Tratamientos	3	15,33	5,11	0,12	2,78
Error Experimental	56	2 410,00	43,04		
TOTAL	59				

Los tratamientos también son homogéneos en cuanto a la edad

Anexo 2. Registro de resultados de laboratorio pre y pos dosificación, peso vivo y dosis terapéutica de cada fármaco.

Tabla 7. T₀ Grupo control.

N ^a de Animales	Identificación	HPG día 0	HPG día 28	Peso (kg)	Dosis (mL)	Edad (meses)
1	Core	7	9	305	—	17
2	Noemia	3	13	410	—	25
3	Voce	7	2	430	—	21
4	Sabrosa	2	1	445	—	24
5	Ildiña	1	27	532	—	30
6	Perla	25	20	302	—	17
7	Juliana	28	25	320	—	15
8	Tostada	1	3	298	—	12
9	Lisha	2	1	370	—	19
10	Yau	11	24	315	—	18
11	Mas mas	1	1	510	—	30
12	América	3	2	305	—	13
13	Indra	11	10	220	—	11
14	Moneda	3	2	500	—	30
15	Agora	6	3	335	—	20
Total		111	143			

Tabla 8. T₁ Grupo triclabendazol.

N° de Animales	Identificación	HPG Día 0	HPG Día 28	Peso (kg)	Dosis (mL)	Edad (meses)
1	Pastusa	7	1	432	57	21
2	Josefa	9	11	303	40	17
3	Goya	3	1	414	55	28
4	Chinela	8	1	450	60	24
5	Tintica	2	1	530	70	30
6	Hermosa	1	1	475	63	32
7	Borgoña	14	8	303	40	12
8	Flecha	7	4	466	62	28
9	Denita	16	2	370	49	17
10	Ilusión	1	1	249	33	15
11	Celeste	3	1	420	55	21
12	Cherry QQ	16	9	340	45	20
13	Nieblita	4	2	200	26	11
14	Picasa	16	20	240	55	12
15	Damiana	3	6	487	64	28
Total		110	69			

Tabla 9. T₂ Grupo triclabendazol más ivermectina Oral.

N° de Animales	Identificación	HPG Día 0	HPG Día 28	PESO (kg)	Dosis (mL)	Edad (meses)
1	Macu	8	1	348	39	17
2	Señorita	3	1	578	64	30
3	Kenko	8	5	432	48	23
4	Prata	1	0	408	45	20
5	Wasy	1	5	447	49	31
6	Jarrita	24	18	198	22	10
7	Chamame	23	16	249	28	12
8	Sureña	1	1	290	32	12
9	Moida	2	1	314	35	21
10	Nidia	14	1	457	50	20
11	Pacora	2	0	551	61	30
12	Yapada	11	9	290	32	16
13	Agenda	5	1	320	35	16
14	Chuva	7	3	496	55	24
15	Geladera	1	0	348	38	21
Total		111	62			

Tabla 10. T₃ Grupo triclabendazol más ivermectina subcutánea.

N° de animales	Identificación	HPG Día 0	HPG Día 28	Peso (kg)	Dosis (mL)		Edad (meses)
					TCBZ	IVM	
1	Risota	1	0	520	69	11	30
2	Pilota 2	5	8	320	42	7	17
3	Abogada	2	0	466	62	10	29
4	Abelita	6	5	457	60	10	24
5	Lupe	1	1	447	59	10	25
6	Ricachona	1	0	512	68	11	30
7	Extra	42	8	296	39	7	15
8	Pilota 1	15	4	264	35	6	17
9	Ñiñe	1	0	249	33	6	12
10	Elegante	2	0	400	53	9	22
11	Mavila	14	2	466	62	10	23
12	Cayajo	3	0	340	45	8	18
13	More	16	10	249	33	6	11
14	Maya	1	0	438	58	10	23
15	Panuda	1	5	426	56	10	23
Total		111	43				

Anexo 3. Técnica Sedimentación Natural modificada por Rojas y Torrel.

Materiales y equipo:

- ✓ Balanza de precisión.
- ✓ Vasos plásticos de 400 mL de capacidad.
- ✓ Vasos de vidrio cónico de 260 mL de capacidad.
- ✓ Embudo con malla metálica de 80 hilos/pul.
- ✓ Placas Petri de 10 centímetros de diámetro, con líneas paralelas de 1 centímetro de separación.
- ✓ Estereoscopio con luz incorporada.
- ✓ Agitador eléctrico (batidora de mano)
- ✓ Estilete (aguja N°22x ½pulg.)

Técnica:

- ✓ De la muestra total de heces (aproximadamente 100g), en un vaso de plástico de 400 mL de capacidad, pesar 1 g de heces
- ✓ Agregar aproximadamente 200 mL de agua de caño, homogenizar la muestra con un agitador eléctrico (batidora de mano), por un tiempo aproximado de 10 segundos.
- ✓ Pasar por un embudo con malla metálica de 80 hilos por pulgada hacia otro vaso de vidrio de forma cónica de 250 mL de capacidad, agregar más agua de caño hasta llenar a 1 cm del borde del vaso.
- ✓ Dejar reposar por 5 minutos.
- ✓ Decantar el sobrenadante dejando aproximadamente 15 mL de sedimento en el vaso.
- ✓ Trasladar el sedimento a una placa petri con rayas paralelas a 10 mm de distancia entre ellas.
- ✓ Colocar 3 gotas de Lugol fuerte, esperar 5 minutos para colorear los huevos.
- ✓ Observar el sedimento en el esteroscopio a 16 aumentos. Es necesario separar las fibras vegetales con un estilete (aguja N° 22 x ½ pulgada) para mejor observación.

Anexo 4. Cálculo de eficacia e intervalos de confianza

a. Cálculo de eficacia:

$$\text{Eficacia \%} = \left(1 - \frac{T_2}{C_2}\right) \times 100$$

Dónde:

T_2 =Media arimética del recuento de huevos del grupo tratado pos medicación.

C_2 =Media arimética del recuento de huevos del grupo control.

- Eficacia de T_1 :

$$\text{Eficacia \%} = \left(1 - \frac{69/15}{143/15}\right) \times 100 = 51,75\%$$

- Eficacia de T_2 :

$$\text{Eficacia \%} = \left(1 - \frac{62/15}{143/15}\right) \times 100 = 56,64\%$$

- Eficacia de T_3

$$\text{Eficacia} = \left(1 - \frac{43/15}{143/15}\right) \times 100 = 69,93\%$$

b. Cálculo del Intervalo de Confianza (IC) para la Eficacia:

Fórmula para el cálculo de IC para proporciones, con un nivel de confianza de 95%:

$$\text{IC} = p \pm 1,96 \sqrt{\frac{(p)(1 - p)}{n}}$$

P = eficacia

n = tamaño de muestra.

- IC para eficacia de T_1 :

$$IC = 51,75 \pm 1,96 \sqrt{\frac{(51,75)(100 - 51,75)}{143}}$$

$$IC = 51,75 \pm 8,19$$

$$IC = 43,56 - 59,94$$

- IC para eficacia de T₂:

$$IC = 56,64 \pm 1,96 \sqrt{\frac{(56,64)(100 - 56,64)}{143}}$$

$$IC = 56,64 \pm 8,12$$

$$IC = 48,52 - 64,76$$

- IC = para eficacia de T₃

$$IC = 69,93 \pm 1,96 \sqrt{\frac{(69,93)(100 - 69,93)}{143}}$$

$$IC = 69,93 \pm 7,52$$

$$IC = 62,41 - 77,45$$

Anexo 5. Prueba de hipótesis para la diferencia de proporciones, con un nivel de significancia de 0,05

Se utilizó la fórmula siguiente:

$$Z_c = \frac{p_1 - p_2}{\sqrt{pq \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

Dónde:

$$p_1 = \frac{x_1}{n_1}$$

$$p_2 = \frac{x_2}{n_2}$$

$$p = \frac{x_1 + x_2}{n_1 + n_2}$$

$$q = (1 - p)$$

- $H_0: T_2 = T_1$ ($P_2 = P_1$)
 $H_a: T_2 > T_1$ ($P_2 > P_1$)

Regla de decisión: se rechaza la hipótesis nula si: $Z_c > Z_\alpha$

$$Z_c = \frac{\frac{81}{143} - \frac{74}{143}}{\sqrt{(0,54)(0,46) \left(\frac{1}{143} + \frac{1}{143} \right)}} = 0,83$$

Se acepta la hipótesis nula, nivel de significancia de 0,05; es decir T_1

es igual que T_2

- $H_0: T_3 = T_1$ ($P_3 = P_1$)
 $H_a: T_3 > T_1$ ($P_3 > P_1$)

Regla de decisión: se rechaza la hipótesis nula si: $Z_c > Z_\alpha$

$$Z_c = \frac{\frac{100}{143} - \frac{74}{143}}{\sqrt{(0,61)(0,39) \left(\frac{1}{143} + \frac{1}{143} \right)}} = 3,14$$

Se rechaza la hipótesis nula, nivel de significancia de 0.05; es decir T_3 es mejor que T_1

- $H_0: T_3 = T_2$ ($P_3 = P_2$)
 $H_a: T_3 > T_2$ ($P_3 > P_2$)

Regla de decisión: se rechaza la hipótesis nula si: $Z_c > Z_\alpha$

$$Z_c = \frac{\frac{100}{143} - \frac{81}{143}}{\sqrt{(0,63)(0,37) \left(\frac{1}{143} + \frac{1}{143} \right)}} = 2,33$$

Se rechaza la hipótesis nula, nivel de significancia de 0.05; es decir T_3 es mejor que T_2

Anexo 6. Registro fotográfico del trabajo de campo.



Figura 01. Fundo San Francisco de Chumbil.



Figura 02. Material biológico.



Figura 03. Recolección de muestra de heces.



Figura 04. Estimación del peso vivo.



Figura 05. Administración de ivermectina subcutánea.



Figura 06. Administración de triclabendazol.