

# **UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA**

## **ESCUELA DE POSGRADO**



**UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS  
VETERINARIAS**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS**

**MENCIÓN: CIENCIAS VETERINARIAS**

**TESIS:**

**DETERMINACIÓN DE NIVELES DE METABOLITOS DE  
TRICLABENDAZOL Y ALBENDAZOL EN LECHE Y SUS POTENCIALES  
EFECTOS INMUNÓTOXICOS POR EXPOSICIÓN CRÓNICA EN OVINOS**

Para optar el Grado Académico de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**MENCIÓN: CIENCIAS VETERINARIAS**

Presentada por:

**M. Sc. MARÍA MANUELA CABRERA NÚÑEZ**

Asesores:

**PhD. PEDRO ORTIZ OBLITAS  
PhD. FELIPE SAN MARTIN HOWARD**

**Cajamarca – Perú**

**2019**

COPYRIGHT © 2019

**MARÍA MANUELA CABRERA NÚÑEZ**

Todos los derechos reservados

# **UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA**

## **ESCUELA DE POSGRADO**



**UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS  
VETERINARIAS**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS**

**MENCIÓN: CIENCIAS VETERINARIAS**

**TESIS APROBADA:**

**DETERMINACIÓN DE NIVELES DE METABOLITOS DE  
TRICLABENDAZOL Y ALBENDAZOL EN LECHE Y SUS POTENCIALES  
EFECTOS INMUNÓTOXICOS POR EXPOSICIÓN CRÓNICA EN OVINOS**

Para optar el Grado Académico de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**MENCIÓN: CIENCIAS VETERINARIAS**

Presentada por:

**M. Sc. MARÍA MANUELA CABRERA NÚÑEZ**

**JURADO EVALUADOR**

PhD. Pedro Luis Ortiz Oblitas  
Asesor

Dr. Teófilo Severino Torrel Pajares  
Jurado Evaluador

Dr. Corpus Hildebrando Cerna Cabrera  
Jurado Evaluador

Dr. Carlos Manuel Rosales Loredó  
Jurado Evaluador

Cajamarca - Perú

2019



**Universidad Nacional de Cajamarca**  
LICENCIADA CON RESOLUCIÓN DE C

**Universidad Nacional de Cajamarca**  
ACTIVO N° 080-2018-SUNEDU/CD



## Escuela de Posgrado

CAJAMARCA - PERU

### PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS

#### ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

#### MENCIÓN: CIENCIAS VETERINARIAS

Siendo las <sup>11:00</sup> horas del día 18 de junio del año dos mil diecinueve, reunidos en el Auditorio de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, el Jurado Evaluador presidido por el **Dr. TEÓFILO SEVERINO TORREL PAJARES** y, **Dr. CORPUS HILDEBRANDO CERNA CABRERA**, **Dr. CARLOS MANUEL ROSALES LOREDO**; y en calidad de Asesor, el **PhD. PEDRO LUIS ORTIZ OBLITAS**. Actuando de conformidad con el Reglamento Interno de la Escuela de Posgrado y el Reglamento del Programa de Doctorado de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, se inició la SUSTENTACIÓN de la tesis titulada: **DETERMINACIÓN DE NIVELES DE METABOLITOS DE TRICLABENDAZOL Y ALBENDAZOL EN LECHE Y SUS POTENCIALES EFECTOS INMUNOTÓXICOS POR EXPOSICIÓN CRÓNICA EN OVINOS**; presentada por la **M.Sc. MARÍA MANUELA CABRERA NÚÑEZ**

Realizada la exposición de la Tesis y absueltas las preguntas formuladas por el Jurado Evaluador, y luego de la deliberación, se acordó <sup>APROBAR</sup> con la calificación de <sup>Dieciocho (18) Excelente</sup> la mencionada Tesis; en tal virtud, la **M.Sc. MARÍA MANUELA CABRERA NÚÑEZ**, está apta para recibir en ceremonia especial el Diploma que la acredita como **DOCTOR EN CIENCIAS**, de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias, con Mención en **Ciencias Veterinarias**

Siendo las <sup>12:45</sup> horas del mismo día, se dio por concluido el acto.

PhD. Pedro Luis Ortiz Oblitas  
Asesor

Dr. Teófilo Severino Torrel Pajares  
Presidente-Jurado Evaluador

Dr. Corpus Hildebrando Cerna Cabrera  
Jurado Evaluador

Dr. Carlos Manuel Rosales Loredo  
Jurado Evaluador

A:

DIOS y a La Virgen de Guadalupe.

A mi esposo. A mis hijas Fiorella, Alicia Lorena, Camila y a mi nieta Emily, por su alegría, amor incondicional y constante apoyo en la realización del presente trabajo durante todos estos años.

A ti mamá, mujer luchadora, de avanzada en su tiempo, siempre agradeceremos todo lo que has hecho por nosotros.

A mi papá, compañero de aventuras, gracias por ayudarme en ésta, a tus noventa y cuatro años.

A mis hermanos, por acompañarme, incentivar me constantemente y por las alegrías compartidas.

*“Success is not final, failure is not fatal,  
it is the courage to continue that counts”*

*Winston Churchill*



## AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, el Dr. Pedro Ortiz Oblitas y al Dr. Felipe San Martín Howard, quienes han sido una fuente constante y generosa de estímulo, paciencia y experiencia, trabajar con destacados profesionales ha sido motivo de superación profesional.

Agradezco a la Universidad Nacional de Cajamarca y a sus autoridades por proporcionar generosamente todos los fondos que me permitieron realizar este estudio, que de otro modo no habría sido posible y por lo cual estoy especialmente agradecida.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias, por concederme la autorización para desarrollar el presente trabajo y proporcionar las facilidades de las instalaciones y laboratorios durante el curso de la presente investigación.

Al Dr. José Pérez, Dr. Rafael Zafra y a la Dra. Isabel Pacheco de la Universidad de Córdova y a la Dra. Dianna Williams de la Universidad de Liverpool, por proporcionarme información y materiales invaluable, que no hubiera podido conseguir sin su ayuda.

Expreso mi reconocimiento y gratitud a los docentes de Postgrado en Ciencias Veterinarias, por compartir sus conocimientos y experiencias.

Al Dr. Severino Torrel Pajares, por sus importantes sugerencias y correcciones en la redacción del presente informe.

Al Dr. Roberto Acosta Gálvez, y al Dr. Orlando Lucas, por su colaboración en el estudio de residuos.

Al Ingeniero Luis Robles Cabrera por su valioso asesoramiento en el análisis estadístico y apoyo técnico.

Muchas gracias a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo.

## CONTENIDO

Ítem	Página
<b>DEDICATORIA</b> .....	v
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	vi
<b>CONTENIDO</b> .....	vii
<b>LISTA DE ILUSTRACIONES</b> .....	ix
<b>LISTA DE ABREVIACIONES</b> .....	xi
<b>RESUMEN</b> .....	xiii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiv
<b>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO</b> .....	5
2.1. Antecedentes Teóricos de la Investigación .....	5
2.2. Bases Teóricas .....	8
<b>CAPÍTULO III: DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS</b> .....	36
3.1. Hipótesis de Investigación .....	36
3.2. Diseño Metodológico .....	36
3.3. Metodología experimental para la detección de metabolitos de TCBZ y ABZ.....	38
3.4. Equipos .....	39
3.5. Cromatografía líquida .....	39
3.6. Espectrometría de masas .....	40
3.7. Procedimiento de validación .....	40
3.8. Metodología experimental evaluación del efecto del TCBZ sobre los valores de recuentos de eritrocitos, hematocrito, leucocitos, subpoblaciones linfocitarias CD4 y CD8 y la expresión de citoquinas IL4 e IFN $\gamma$ en linfocitos T de sangre periférica de ovinos infectados con <i>F. hepatica</i> .....	43

3.9. Análisis estadístico.....	48
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>50</b>
4.1. Resultados de la determinación de metabolitos de TCBZ y ABZ. ....	50
4.2. Resultados de la evaluación del efecto del TCBZ sobre los valores hematológicos, parasitológicos e inmunológicos: Eritrocitos, hematocrito, recuento diferencial de leucocitos, linfocitos CD4 y CD8 y la expresión de citoquinas IL4 e IFN $\gamma$ en linfocitos T de sangre periférica de ovinos infectados con <i>F. hepatica</i> y ovinos control .....	59
<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES .....</b>	<b>67</b>
<b>CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES .....</b>	<b>69</b>
<b>LISTA DE REFERENCIAS .....</b>	<b>70</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>87</b>

## LISTA DE ILUSTRACIONES

Tablas	Página
<p><b>Tabla 1:</b> Residuos de los analitos (%) triclabendazol (TCBZ), triclabendazol sulfóxido (TCBZ SO), triclabendazol sulfona (TCBZ SO<sub>2</sub>), albendazol (ABZ), albendazol sulfóxido (ABZSO) y albendazol sulfona (ABZSO<sub>2</sub>) detectados en muestras de leche cruda bovina comercializada en el distrito de Cajamarca, mediante LC-MS/MS.....</p>	50
<p><b>Tabla 2:</b> Residuos de metabolitos de TCBZ (%) detectados en muestras de leche comercializada en el distrito de Cajamarca, mediante LC-MS/MS.....</p>	51
<p><b>Tabla 3:</b> Concentraciones de los analitos de TCBZ y ABZ (µg/kg) en las muestras de leche positivas.....</p>	52
<p><b>Tabla 4:</b> Porcentaje de muestras de leche entre el Nivel Límite de detección (LLD) y muestras por encima de los LMRs para TCBZ y ABZ.....</p>	53
<p><b>Tabla 5:</b> Efecto del tratamiento antihelmíntico con TCBZ sobre los valores promedios de los parámetros hematológicos (±DS), de ovinos en tratamiento infectados con <i>F. hepatica</i> y de ovinos del grupo control no infectados.....</p>	59
<p><b>Tabla 6:</b> Efecto del tratamiento antihelmíntico con TCBZ en los valores promedios de subpoblaciones linfocitarias (CD4 y CD8) y citoquinas IL4 e INFγ (±DS), de ovinos infectados con <i>F. hepatica</i> y de ovinos controles no infectados.....</p>	60
<p><b>Tabla 7:</b> Efecto del tratamiento antihelmíntico con TCBZ en los Recuentos promedio de huevos de <i>F. hepatica</i> (hpg) y el % de Eficacia (FECRT) en ovinos infectados con <i>F. hepatica</i> y en ovinos controles no infectados.....</p>	60
<p><b>Tabla 8:</b> Eficacia (%) del TCBZ contra <i>F. hepatica</i> en ovinos después de 7 tratamientos consecutivos con TCBZ, en dosis de 12 mg/ kg (3 dosis), 24 mg/ kg (2 dosis), 48 mg/ kg (2 dosis) vía oral, según FECRT.....</p>	61

<b>Cuadros</b>	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b> Eficacias comparativas de los compuestos antitrematodes más utilizados contra las diferentes etapas de la <i>F. hepática</i> .....	34
<b>Cuadro 2.</b> Número de muestras requerido para detectar por lo menos un resultado fuera de cumplimiento con probabilidades predefinidas (90, 95 y 99 por ciento) en población con frecuencia de incumplimiento conocida.....	38
<b>Cuadro 3.</b> Seguimiento de Reacciones Múltiples (MRM), con 2 transiciones. Método LC-MS/MS.....	43
<b>Cuadro 4.</b> Del diseño experimental y procedimientos.....	44

<b>Figuras</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Triclabendazol (TCBZ) y sus principales metabolitos: estructuras químicas y vías metabólicas.....	9
<b>Figura 2.</b> Esquema del Ciclo biológico de <i>F. hepática</i> .....	27
<b>Figura 3.</b> Residuos de los metabolitos (%) triclabendazol (TCBZ), triclabendazol sulfóxido (TCBZ SO), triclabendazol sulfona (TCBZ SO <sub>2</sub> ), albendazol (ABZ), albendazol sulfóxido (ABZSO) y albendazol sulfona (ABZSO <sub>2</sub> ) detectados en muestras de leche cruda bovina comercializada en el distrito de Cajamarca, mediante LC-MS/MS.....	51
<b>Figura 4:</b> Resultados de la recuperación de todos los niveles de analitos de BZ (TCB, ABZ, FBZ) ((µg/kg) en las matrices positivas estudiadas.....	52

## LISTA DE ABREVIACIONES

<b>ABZ</b>	:	Albendazol
<b>ABZSO</b>	:	Albendazol sulfóxido
<b>ABZSO<sub>2</sub></b>	:	Albendazol sulfona
<b>BZD</b>	:	Benzimidazol
<b>CD4</b>	:	Cluster de diferenciación 4
<b>CD8</b>	:	Cluster de diferenciación 8
<b>EMEA</b>	:	<i>European Medicines Agency</i> Agencia Europea de Medicamentos
<b>FBZ</b>	:	Fenbendazole
<b>FECRT</b>	:	Faecal Egg Count Reduction Test
<b>IL4</b>	:	Interleuquina 4
<b>INF<math>\gamma</math></b>	:	Interferón gamma
<b>Joint FAO/IAEA</b>	:	División Mixta FAO/OIEA de Técnicas Nucleares en la Alimentación y la Agricultura. Servicio conjunto del OIEA y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).
<b>LC-MS/MS</b>	:	<i>Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry</i> Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem
<b>LMR</b>	:	Límite Máximo para Residuos
<b>LOD</b>	:	<i>Limit of Detection</i> Límite de Detección
<b>LOQ</b>	:	<i>Lower Limit of Quantification</i> Límite menor de cuantificación

**SENASA** : Servicio Nacional de Sanidad Agraria

**TCBZ** : Triclabendazol

**TCBSO<sub>2</sub>** : Triclabendazol sulfona

**TCBZSO** : Triclabendazol sulfóxido

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó con el objetivo de determinar la presencia de niveles de residuos en leche de los antihelmínticos benzimidazoles Triclabendazol (TCBZ) y Albendazol (ABZ), usados frecuentemente en el control de *Fasciola hepatica*, parásito trematode que afecta a rumiantes domésticos, principalmente bovinos y ovinos, se evaluó además sus potenciales efectos inmunotóxicos por exposición crónica en ovinos. Se determinó la presencia de niveles de los metabolitos residuales del TCBZ (TCBZ SO y TCBZ SO<sub>2</sub> y ABZ (ABZSO y ABZSO<sub>2</sub>) en 30 muestras de leche cruda bovina comercializada en el distrito de Cajamarca mediante la técnica de Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem (LC-MS/MS). El método fue validado de acuerdo con las directrices 2002/657/EC. La selectividad fue demostrada, los analitos presentaron valores de recuperación entre 80% y 100%. Se demostró la presencia de residuos de TCBZ en el 23% de las muestras analizadas. Las concentraciones de residuos excedieron en el 26.65% (44-305 µg/kg), el LMR permitido. El metabolito TCBZ SO<sub>2</sub> se encontró en el 70% de las muestras positivas, TCBZ SO (20%) y TCBZ (10%) respectivamente. No se encontraron residuos de metabolitos de ABZ. Los resultados obtenidos fueron comparados con los estándares establecidos por el Codex Alimentarius y EMEA. Los resultados indican que en Cajamarca se comercializa leche con residuos de TCBZ. Se evaluó el efecto del TCBZ sobre las respuestas celulares en sangre de: eritrocitos, hematocrito, leucocitos, subpoblaciones linfocitarias CD4 y CD8 y la expresión de citoquinas IL4 e IFN $\gamma$  en linfocitos T de sangre periférica de ovinos infectados con *F. hepatica*. El estudio se llevó a cabo en 14 ovinos, los animales del grupo en tratamiento (n=8) fueron experimentalmente infectados con metacercarias de *F. hepatica* y a 7 tratamientos continuados con TCBZ. El grupo control (n=6) se mantuvo libre a la infección con *F. hepatica* y al tratamiento con antihelmínticos. Los efectos del tratamiento con TCBZ en animales infectados experimentalmente con *F. hepatica*, sobre los valores hematológicos mostraron una disminución significativa de eritrocitos, hematocrito y leucocitos (p<0.05), se observó una leve a moderada linfopenia, neutrofilia y eosinofilia. Los valores hematológicos en el grupo control estuvieron dentro de los rangos normales de referencia, excepto por una leve neutrofilia y eosinofilia transitoria al inicio y al final del experimento respectivamente. Los leucocitos al inicio del tratamiento mostraron una elevación moderada, para luego observarse leucopenia (p<0.05) en el grupo infectado. Las respuestas de Linfocitos CD4 y CD8 se encontraron elevadas en comparación con el grupo control, la respuesta de citoquina IL4 tuvo mayor expresión en relación a IFN $\gamma$  en comparación con el grupo control (p<0.05) durante la fase crónica de la enfermedad y durante el tratamiento con TCBZ. Se evaluó la eficacia del TCBZ, mediante la prueba de FECRT, mostrando una reducción para el grupo en tratamiento del 40.64% después de 7 tratamientos consecutivos. La eficacia del TCBZ a las dosis de 12, 24 y 48 mg/kg. de p.v. administrados por vía oral, en ovinos artificialmente infectados con *F. hepatica*, fue de 53.10%, 26.65%, 25.53%, 26.55%, 41.40%, 54.54% y 55.64% respectivamente. Se concluye que, a pesar del incremento en las dosis de desafío del antihelmíntico suministrado a intervalos de tiempo muy corto, no mejoró el porcentaje de eficacia del TCBZ.

**Palabras clave:** Triclabendazol, *Fasciola hepatica*, Residuos de TCBZ y ABZ en Leche, LC-MS/MS, Respuesta Inmune celular.

## ABSTRACT

This research work was carried out with the objective of determining the presence of residues levels in milk of the benzimidazole anthelmintic, Triclabendazole (TCBZ) and Albendazole (ABZ), commonly used in the control of *Fasciola hepatica*, trematode parasite that affect domestic ruminants, mainly cattle and sheep, its potential immunotoxic effects were also assessed by chronic exposure in sheep. The presence of levels of residual metabolites of TCBZ (TCBZ SO and TCBZ SO<sub>2</sub> and ABZ (ABZSO and ABZSO<sub>2</sub>) in 30 samples of bovine raw milk marketed in the district of Cajamarca was determined by the Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) technique. The method was validated in accordance with guidelines 2002/657/EC. The selectivity was demonstrated, the analytes showed recovery values between 80% and 100%. The presence of TCBZ residues was demonstrated in 23% of the samples analyzed. The concentrations of residues exceeded 26.65% (44-305 µg/kg), the MRL allowed. The metabolite TCBZ SO<sub>2</sub> was found in 70% of the positive samples, TCBZ SO (20%) and TCBZ (10%) respectively. No residues of ABZ metabolites were found. The results obtained were compared with the standards established by the Codex Alimentarius and EMEA. The results indicate that in Cajamarca, milk with TCBZ residues is commercialized. The effect of TCBZ on the cellular responses in blood of: erythrocytes, hematocrit, leukocytes, CD4 and CD8 lymphocyte subpopulations and the expression of cytokines IL4 and IFN $\gamma$  in peripheral blood T lymphocytes of sheep infected with *F. hepatica* was evaluated. The study was carried out in 14 sheep, the animals of the group under treatment (n = 8) were exposed experimentally to fasciola and to 7 continued treatments with TCBZ. The control group (n = 6) remained free from infection with fasciola and treatment with antihelmintics. The effects of treatment with TCBZ in animals experimentally infected with *F. hepatica*, on the hematological values showed a significant decrease of erythrocytes, hematocrit and leukocytes (p<0.05), a mild to moderate lymphopenia, neutrophilia and eosinophilia were observed. The hematological values in the control group were within the normal reference ranges, except for a mild neutrophilia and transient eosinophilia at the beginning and at the end of the experiment respectively. The leukocytes at the beginning of the treatment showed a moderate elevation, and then leukopenia (p<0.05) was observed in the infected group. The responses of CD4 and CD8 lymphocytes were found to be high compared to the control group, the cytokine IL4 response had higher expression in relation to IFN $\gamma$  compared to the control group (p<0.05) during the chronic phase of the disease and during the treatment with TCBZ. The efficacy of TCBZ was evaluated by means of the FECRT test, showing a reduction for the treatment group of 40.64% after 7 consecutive treatments. The efficacy of TCBZ at doses of 12, 24 and 48 mg/ kg. from p.v. administered orally, in sheep artificially infected with *F. hepatica*, was 53.10%, 26.65%, 25.53%, 26.55%, 41.40%, 54.54% and 55.64% respectively. It was concluded that despite the increase in challenge doses with the anthelmintic delivered in very short time intervals, the efficiency percentage of the TCBZ did not improve.

**Key words:** Triclabendazol, *Fasciola hepatica*, Triclabendazol and Albendazol Residues in milk, LC-MS/MS, Celular Immune Response.

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

Los fasciolicidas TCBZ y ABZ, son antihelmínticos benzimidazoles (BZDs), utilizados en terapéutica veterinaria para tratar la fasciolosis, enfermedad parasitaria causada por el trematode digeneico *Fasciola hepatica*. La fasciolosis afecta a los rumiantes domésticos, principalmente bovinos y ovinos en todo el mundo (Mehmood et al., 2017). Es una parasitosis endémica en el Perú, especialmente en valles interandinos como Cajamarca, en donde se reportan prevalencias en el ganado vacuno de 75% y 43% (SENASA, 2007; Torrel et al., 2014), 61,9% en ovinos (Chuquiruna, 2011) y es, además, considerada una enfermedad tropical desatendida en humanos (Mas-Coma et al., 2005) con prevalencias en niños entre 6,5% y 47,7% (Rodríguez et al., 2018, González et al., 2011). La fasciolosis es uno de los principales problemas de salud en Cajamarca por las pérdidas económicas causadas en animales de producción, con una pérdida anual estimada de 12 millones de dólares (Espinoza et al., 2010), por el emergente incremento de la resistencia antihelmíntica (Ortiz et al., 2013; Rojas, 2012) y el riesgo de la presencia de residuos químicos en la leche (Imperiale et al., 2011) y otros productos de origen animal.

El tratamiento de la fasciolosis se basa casi exclusivamente en el empleo de antihelmínticos de forma estratégica con fines profilácticos y terapéuticos. Los ganaderos controlan la fasciolosis con programas tradicionales, promediando 3.7 tratamientos por año. La infección tiene un ciclo anual, con el mayor período de infección de enero a marzo (Claxton et al., 1998), elevándose en estos meses los problemas producidos por la parasitosis, requiriéndose de tratamientos adicionales para el control efectivo de la enfermedad. El control es implementado mediante el uso regular de antihelmínticos como el TCBZ, ABZ, nitroxinil, clorsulón, closantel, ivermectinas o tratamientos combinados,

aun en animales en lactación, de forma inapropiada, poniendo en riesgo elevado la salud de la población debido a la presencia de residuos de estos medicamentos que ingresarían a la cadena alimentaria.

El TCBZ y el ABZ, no están autorizados para ser usados en el ganado vacuno en período de lactación, cuya producción láctea esté destinada para consumo humano, siendo el período de retiro de 28 días para el TCBZ y para el caso del ABZ no debe ser administrado durante los primeros 45 días en animales en gestación (Novartis Animal Health, 2016). Los residuos de antihelmínticos en productos de origen animal podrían tener efectos adversos en la salud de los consumidores, ya que se ha reportado embriotoxicidad y teratogenicidad en una variedad de especies domésticas y que pueden ser causados por la droga madre o por sus metabolitos activos, siendo en algunos casos los metabolitos más tóxicos que el fármaco original (EMEA, 2001, 2004; Ramírez et al., 2001, Hurtt et al., 2003; Boix et al., 2015).

Cajamarca es una de las principales cuencas lecheras del Perú, ubicándose en el segundo lugar de producción nacional con el 17,2% de producción lechera después de Arequipa (MINAGRI, 2014). La leche es uno de los alimentos más consumidos en el mundo y su producción ha mostrado un aumento continuo (Oliveira et al., 2010). La producción de leche inocua y de calidad, es prioridad en salud pública para la región, ya que es insustituible en la alimentación de las personas por su alto contenido nutricional. En el Perú, el mercado de la leche cruda es regulada por parte de las autoridades sanitarias del país MINSA/DIGESA. Sin embargo, no se cuenta con parámetros regulatorios establecidos en leche para residuos de antiparasitarios, siendo necesario hacer referencia a los LMR reportados por organizaciones tales como FAO/OMS Codex Alimentarius y EMEA.

Así mismo, los tratamientos con antihelmínticos han sido asociados con reacciones inflamatorias locales (Betancourt et al., 2014). Paradójicamente, el tratamiento con fármacos puede ser eficaz contra diferentes estadios parasitarios, pero también podría tener diferentes consecuencias clínicas como daño tisular por muerte de larvas (Steinbach et al., 2006), tener efectos sobre los valores hematológicos, bioquímicos o estimular la expresión de genes de citoquinas proinflamatorias (Martínez-Moreno et al., 1997; Betancourt et al., 2014; Shrimali et al., 2016). Se sabe que las infecciones por *F. hepatica* modulan las respuestas celulares y de citoquinas, sin embargo, se han llevado a cabo muy pocos estudios con la finalidad de estudiar los efectos del tratamiento con TCBZ sobre la dinámica de la respuesta inmune celular en la fasciolosis ovina. Por lo anteriormente mencionado se planteó la siguiente pregunta de investigación ¿Cuáles son los niveles de metabolitos de TCBZ y ABZ que se encuentran en la leche cruda bovina comercializada en el distrito de Cajamarca y cuáles son los efectos del TCBZ sobre el sistema inmune de ovinos? Los objetivos propuestos en el presente trabajo fueron:

**Objetivo general:**

Determinar los niveles de metabolitos del Triclabendazol (TCBZ) y Albendazol (ABZ) en leche cruda bovina comercializada en el distrito de Cajamarca, evaluar el efecto inmunotóxico y la eficacia del TCBZ por exposición crónica en ovinos.

**Objetivos específicos:**

1. Determinar los niveles de metabolitos del TCBZ y ABZ en leche cruda bovina comercializada en el distrito de Cajamarca, mediante la técnica de Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem (LC/MS/MS)

2. Evaluar el efecto inmunotóxico del TCBZ en sangre periférica de ovinos infectados experimentalmente con *F. hepatica* sobre los recuentos de eritrocitos, hematocrito, leucocitos, subpoblaciones linfocitarias CD4 y CD8 y de citoquinas IL4 e IFN $\gamma$ .
3. Evaluar la eficacia del TCBZ en ovinos infectados experimentalmente con *F. hepatica*.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Antecedentes Teóricos de la Investigación

##### 2.1.1. Residuos de metabolitos de TCBZ y ABZ en leche

En el Perú, en los últimos años muy pocos autores han publicado resultados de investigaciones sobre residuos de antihelmínticos en la leche. En Cajamarca, se reportaron concentraciones residuales del TCBZ en leche y queso de vacas productoras de leche, los cuales persistieron en la leche entre 36 y 144 horas después del tratamiento, el trabajo empleó el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), igualmente se demostró que los residuos de TCBZ se pueden encontrar incrementados hasta en 13 veces más en el queso proveniente de la venta comercial (Imperiale et al., 2011). En un trabajo realizado en el distrito de Cajamarca para determinar la presencia de residuos de los analitos TCBZ y TCBZSO en 29 muestras de queso y 25 muestras de leche para consumo humano, se reportó que no hubo presencia de residuos, por lo que se consideraron libres del antiparasitario, el estudio fue realizado mediante el método de HPLC (Reyna y Palacios, 2014).

A nivel internacional, se han realizado diversos estudios sobre el metabolismo y la persistencia de residuos en la leche. En Irlanda, se informó que los residuos de TCBZ persistieron en la leche durante al menos 10 días después del tratamiento (Danaher et al., 2007). En un trabajo de investigación tras el tratamiento de vacas en seca y en lactancia, se encontró que los residuos de TCBZ persistieron en la leche durante al menos 20 días, las concentraciones medias fueron inferiores a los LMR recomendadas por la Unión Europea de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

Los resultados de este estudio mostraron que son necesarios periodos largos de abstinencia para garantizar que los residuos se encuentren por debajo de los LMR. Esto limita su utilidad en vacas en lactación. Después del tratamiento en vacas en seca, las concentraciones en la leche fueron  $<1 \mu\text{g kg}^{-1}$  después del parto. Estos resultados indican que, si se administra TCBZ en las vacas secas, los niveles de residuos cumplen con la legislación si el período de retiro es de 60 días, asimismo el TCBSO<sub>2</sub> representó  $\geq 87\%$  de los residuos detectados y persistieron más del doble de tiempo que cualquier otro metabolito de TCBZ después del tratamiento de las vacas en lactación, mencionando que es importante que los métodos analíticos incluyan TCB-SO<sub>2</sub> para garantizar la seguridad alimentaria (Power et al., 2013). En Tokio, se detectaron residuos de TCBZ empleando el método HPLC aplicado al análisis de 10 muestras de leche cruda de vacas para el mercado, los límites de detección fueron de 0,004-0,006 mg/g en leche (Takeba et al., 2000).

Se examinaron 123 muestras de leche de vacuno, ovinos y cabras del mercado griego, se evaluaron residuos de ABZ y FBZ utilizando el método HPLC/DAD Diode Array Detector. Se encontró un alto porcentaje (27.6%) de muestras positivas, y en 14 muestras (11,4%) los residuos excedieron los límites máximos en las muestras de leche bovina (Tsiboukis et al., 2013).

En Brasil, evaluaron la presencia de residuos de antimicrobianos y de antihelmínticos (BZ, aminobenzimidazoles, levamisol, avermectinas, tiabendazoles, moxidectina y TCBZ), en 70 y 83 muestras respectivamente de leche cruda provenientes de cuatro macro regiones del estado de Minas Gerais. Este estudio demostró la presencia de quinolonas (2,86%), estreptomicinas (2,86%) y tetraciclinas (11,43%) en las muestras de leche crudas analizadas. En

lo que respecta a antiparasitarios, se observó un alto porcentaje de muestras de leche cruda positivas para los antihelmínticos amino-benzimidazoles (55,42%), levamisol (53,57%), avermectina (60,24%), tiabendazol (67,47%), moxidectina (73,49%) y TCBZ (45,78%), (Cerqueira et al., 2014).

### **2.1.2. Efectos del tratamiento con TCBZ en el sistema inmune**

La presencia de residuos en la cadena alimentaria humana adquiere especial relevancia considerando que el sulfóxido de triclabendazol (TCBZSO), el primer metabolito activo del TCBZ, tiene potencial embriotóxico (Boix et al., 2015; Hurtt et al., 2003).

En un estudio de eficacia comparativa del closantel, triclabendazol + ivermectina y oxyclozanida + levamisol (Shrimali et al., 2016) se evaluaron los efectos sobre valores hematobioquímicos realizados en cabras infectadas con *Fasciola*, se encontró que los recuentos totales de leucocitos y bioquímicos, estuvieron significativamente reducidos de su nivel normal en los grupos tratados. Se examinó la influencia del tratamiento con TCBZ en la fisiopatología de la fasciolosis en cabras, en términos de parámetros hematológicos, niveles enzimáticos séricos, y en la dinámica de producción de anticuerpos específicos. Se encontró una anemia moderada asociada con la presencia de trematodos maduros e inmaduros en los conductos biliares. El tratamiento con TCBZ, al eliminar la mayoría de estos trematodos, redujo en gran medida las alteraciones hematológicas. Los niveles de las enzimas hepáticas en suero reflejaron el daño hepático. La respuesta de anticuerpos también se vio afectada por el tratamiento con TCBZ, en todos los animales tratados se observó un pico en los niveles de anticuerpos entre las semanas 9 y 13, seguido de una disminución cuya magnitud dependía de la eficacia del tratamiento. En aquellos animales en los que el TCBZ

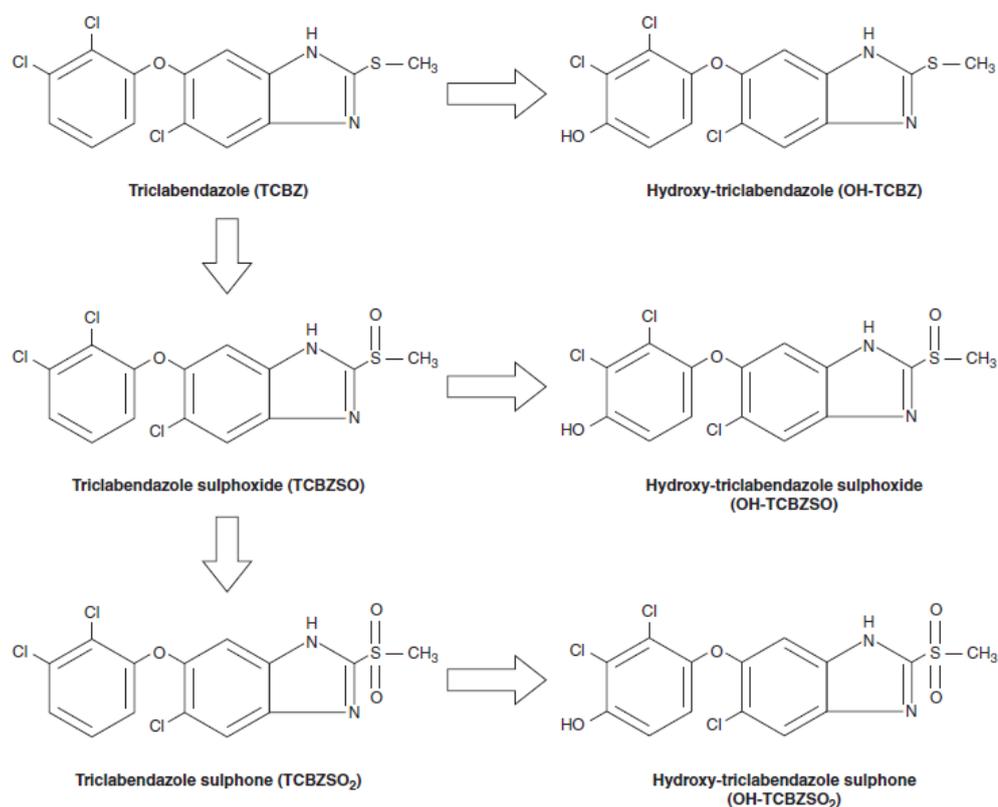
fue altamente efectivo, los niveles de anticuerpos volvieron a valores negativos similares a los registrados pre inoculación a las 18-21 semanas post infección (Martínez-Moreno et al., 1997).

## 2.2 Bases Teóricas

### 2.2.1 Triclabendazol (TCBZ)

Triclabendazol es el nombre genérico del 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxil)-2 [metiltio]-1H-benzimidazol, con un peso molecular de 359,66. Su estructura química está representada en la Figura 1. Es un derivado BZD halogenado que fue sintetizado por Ciba-Geigy en 1978. La presencia de átomos clorinados y un grupo tiometilo en ausencia del carbamato y su estructura en forma de U diferencia al TCBZ de otros BZDs (Bennett y Bryant, 1984). El TCBZ es una sustancia cristalina blanca, que es poco soluble en agua, pero soluble en metanol. El medicamento ha estado disponible desde 1983 como suspensiones para uso veterinario (Fasinex) y recientemente como comprimidos de 250 mg (Egaten®, Novartis) para uso humano (WHO, 2007).

Por las diferencias mencionadas anteriormente el TCBZ tiene una actividad inusual, ya que, a diferencia de otros BZDs, su acción está restringida a *F. hepatica*, *F. gigantica*, *Fascioloides magna* y *Paragonimus spp.* No tiene eficacia clínica contra nematodos y cestodos y contra otros trematodos, incluyendo *Dicrocoelium dendriticum*, *Schistosoma mansoni* y *Paramphistomum spp.* (Coles, 1986; Dalton, 1998). Esta molécula es la única reconocida con elevada eficacia sobre estadios inmaduros de hasta 1 semana de edad y estados maduros de *F. hepatica* (Boray et al., 1983, Lanusse, 2009), Cuadro1.



**Figura 1.** Triclabendazol (TCBZ) y sus principales metabolitos: estructuras químicas y vías metabólicas (Riviere y Papich, 2018).

El TCBZ ofrece una ventaja sobre otros fasciolicidas ya que se puede administrar como un tratamiento único al inicio del período de vaca seca. Pueden producirse residuos en la leche si no se respetan los períodos de retiro recomendados, si las vacas se tratan durante la lactancia, o si se tratan durante el período seco y los residuos se excretan al comenzar la lactancia después del parto. El momento más adecuado para tratar las vacas lecheras es durante el período seco, cuando no se produce leche para consumo humano (Power et al., 2013, 2013a). La legislación de la Unión Europea no autoriza el uso de TCBZ, mebendazol, doramectina y abamectina en animales que producen leche para consumo humano.

### **2.2.2. Mecanismo de Acción del TCBZ**

El mecanismo de acción preciso del TCBZ no está bien establecido aún, el fármaco original TCBZ es rápidamente metabolizado en el hígado hacia su metabolito activo triclabendazol sulfóxido (TCBZSO), responsable de la actividad fasciolicida y a triclabendazol sulfona (TCBZSO<sub>2</sub>) el metabolito inactivo (Alvinerie y Galtier, 1986; Hennessy et al., 1987). Se dice que actúa dañando la integridad y funciones de transporte de energía en las células del parásito (Taylor, 2000), desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Carr et al., 1993) e inhibe la síntesis de proteínas del parásito (Stitt et al., 1995). En general, la actividad nematocida de los BZDs se basa en su unión a la  $\beta$ -tubulina del parásito (Lacey et al., 1987, Lacey, 1988), inhibiendo la polimerización de los microtúbulos. Por lo tanto, todas las funciones atribuidas a los microtúbulos a nivel celular están alterados (división celular, mantenimiento de la forma de la célula, movilidad celular, secreción celular, absorción de nutrientes, y transporte intracelular). Las moléculas de los BZD metilcarbamato como el ABZ o el FBZ actúan sobre los microtúbulos de los nematodos en el sitio de unión de la tubulina colchicina (Lacey, 1988). Es probable que los metabolitos del TCBZ se dirijan a un sitio alternativo de unión en la molécula de tubulina (Fairweather, 2005), ya que, hay datos concluyentes que respaldan la unión del TCBZ a la tubulina de la fasciola, lo que también podría explicar su falta de eficacia contra otros parásitos helmintos. Se ha demostrado que el metabolito TCBZSO bloquea el transporte de los cuerpos secretores desde las células del cuerpo hasta la superficie tegumentaria, culminando en la pérdida total del tegumento (Stitt y Fairweather, 1994). TCBZSO también inhibe la división mitótica de las células espermatogénicas y de las células vitelinas madre, así como todos los cambios

relacionados con la inhibición de la función de los microtúbulos.

### **2.2.3 Farmacocinética del TCBZ**

El patrón básico de biotransformación del TCBZ en rumiantes fue establecido por Hennessy et al. (1987). El TCBZ se metaboliza en varios compuestos (para sus estructuras, ver figura 1. El TCBZ se elimina completamente de la sangre vía portal por el hígado y no puede ser detectado en el plasma. De la dosis administrada, más del 90% de la dosis total se excreta en las heces, 2% en la orina y menos de 1% en la leche (Kinabo y Bogan, 1988), el 45% se secreta en la bilis y solo el 6,5% se excreta en la orina (Hennessy et al., 1987). Se oxida a los metabolitos sulfóxido (TCBZSO) y sulfona (TCBZSO<sub>2</sub>), que son los principales metabolitos presentes en el plasma.

La hidroxilación del TCBZ y sus dos metabolitos tiene lugar también en el hígado, dando lugar a los correspondientes metabolitos hidroxilados, los cuales son excretados en la bilis (Hennessy et al., 1987). La ruta flavin monooxygenasa (FMO) es la vía principal implicada en la conversión de TCBZ a TCBZSO, mientras que contribuye igualmente a la sulfonación de TCBZSO a TCBZSO<sub>2</sub> el sistema enzimático del citocromo P450 (Mottier et al., 2004; Virkel et al., 2006). Se ha demostrado que la microflora del rumen es capaz de realizar la sulforeducción de TCBZSO y OH-TCBZSO a TCBZ y OH-TCBZ, respectivamente, lo que sugiere que el rumen puede actuar como un depósito de compuestos de TCBZ. Esto podría servir como un sistema de liberación lenta para una mayor disponibilidad de TCBZ en el tracto digestivo, desde donde podría ser absorbido y transferido al hígado (Virkel et al., 2006). El TCBZ también puede ser oxidado a TCBZSO por la microflora ruminal antes de su absorción o por la pared intestinal durante la absorción (Mestorino et al., 2008). Un estudio comparó

la farmacocinética del TCBZ en ovinos y bovinos (Mestorino et al., 2008). Los parámetros para TCBZSO fueron similares en las dos especies, aunque los niveles sanguíneos máximos se alcanzaron más tardíamente en el ganado vacuno (30 h frente a 22 h en el ganado ovino). Sin embargo, los datos fueron muy diferentes para TCBZSO<sub>2</sub>, que alcanzó una concentración máxima más alta y persistió a niveles más altos durante más tiempo en el ganado vacuno (Mestorino et al., 2008).

### **Formulación y dosificación**

El TCBZ se administra en solución acuosa por vía oral, intraruminal o intraabomasal. Existen varias formulaciones que incluyen suspensiones al 10% para ovinos y caprinos, al 10% y 12% para bovinos. Además, está disponible como suspensión en combinación con ABZ y levamisol para el control de las parasitosis por nematodos y trematodos en las especies mencionadas (FAO, 1993).

#### **2.2.4. Toxicidad del TCBZ**

En relación a la toxicidad, la dosis máxima tolerable es de 200 mg/kg, en algunos animales se observa incoordinación del tren posterior durante un período de tres a seis días, incluso ciertos animales bajan de peso. En general, éste fármaco se caracteriza por una baja toxicidad en mamíferos, por lo que no se describen limitaciones para su administración, incluso en individuos jóvenes, enfermos o débiles (Taylor, 2000, Yoshimura, 1987). El período de retirada para TCBZ, oscila entre 20-28 días en carnes (FAO, 1993). El TCBZ produce una mínima irritación en piel. Dosis repetidas en ratas conteniendo 10, 100 o 1000 mg/kg de peso corporal de TCBZ, revelaron un menor efecto hematológico y algunos como incremento en la albúmina sanguínea, colesterol, fueron vistos en dosis altas

como 100 mg/kg de peso corporal. En ovinos con una sola dosis oral de TCBZ de 250, 500 o 1000 mg / kg de peso corporal, causaron la muerte en 1/20, 6/20 y 5/5 animales respectivamente. A dosis de 125 mg/kg de peso fue bien tolerado y no se reporta efectos adversos. En estudios en ratas, ovinos y conejos no hubo datos evidentes de teratogenicidad, sin embargo, hubo bajo peso del feto, en dosis arriba de 50 mg/kg de peso en ovinos machos y hembras no hubo efectos sobre la reproducción. En estudios realizados en ratones y ratas utilizando TCBZ no hubo significancia estadística en los efectos de incidencia a tumores con cualquier dosis o cualquier otro parámetro, aun a dosis de 300 mg/kg en la dieta. Se recomienda no usar TCBZ 28 días antes del sacrificio de los animales destinados para consumo humano, ni consumir la leche de los animales tratados con TCBZ hasta 4 días después de la última aplicación del producto (Novartis Animal Health, 2016).

#### **2.2.5. Eliminación de residuos del TCBZ en la leche**

Se ha demostrado que los metabolitos TCBZSO y TCBZSO<sub>2</sub> pueden ser detectados hasta 7 días en la leche de cabras tratadas con una dosis oral de TCBZ (12 mg/kg de peso corporal). Los niveles más altos de residuos de TCBZ-SO y TCBZSO<sub>2</sub> se encontraron a 1 (160 µg/kg) y 3 (640µg/kg) días después del tratamiento, respectivamente. Las concentraciones plasmáticas máximas para el sulfóxido y sulfona fueron similares en el rango de 9 a 19 µg/ml y se alcanzaron a un promedio de 12.8 y 25.6 h, respectivamente, después de la administración. Ambos metabolitos se eliminaron lentamente del plasma con promedios de eliminación de 22.4 h para el sulfóxido y 19.4 h para la sulfona. Persistieron en concentraciones medibles en plasma hasta por siete días. En la leche, los dos metabolitos ocurrieron en bajas concentraciones y ninguno de ellos fue detectable

después de siete días (Kinabo y Bogan, 1988). Se investigó la eliminación de residuos de TCBZ en la leche de vacas tratadas con una dosis oral de TCBZ (12 mg/kg de peso corporal). TCBZSO<sub>2</sub> fue el principal residuo presente con determinación de bajos niveles de TCBSO. A las 50 h después del tratamiento, TCBZSO<sub>2</sub> y TCBZSO se encuentra en niveles de 1415 y 100 µg/kg. Residuos de TCBZ-SO y TCBZSO<sub>2</sub> pueden ser detectados hasta 45 y 240 h post-tratamiento. El estudio mostró que el 1.5% de la dosis administrada se excreta en la leche. Se llevaron a cabo estudios similares en vacas tratadas con una dosis oral de TCBZ (12 mg/kg de peso corporal). Se reportaron los datos de los residuos entre las 36 and 144 h, respectivamente. A las 48 h post-tratamiento, de TCBZ, TCBZ-SO y TCBZSO<sub>2</sub> se encontraron en niveles de 6-35, 17-114 y 51-595 µg/kg, respectivamente (Takeba et al., 2000, Imperiale et al., 2011).

Los rumiantes como bovinos, ovinos y caprinos comparten una fisiología gastrointestinal similar. Los datos farmacocinéticos y de residuos disponibles no indican una variabilidad significativa entre el ganado bovino y ovino, por lo que se considera que es poco probable que haya diferencias significativas en estos parámetros. Los LMR existentes para TCBZ y ABZ en las especies bovina y ovina son los mismos valores de LMR, incluyendo la leche (EMEA, 2014). Tanto el calor, como la pasteurización, la fabricación de polvo no afectan la presencia del residuo. Para el TCBZ, incluso a niveles de residuos indetectables en la leche, todavía existe la presencia del residuo en ciertos productos elaborados con esa leche, manteniéndose estables durante el almacenamiento (Power et al., 2013a).

### **2.3. Albendazol (ABZ)**

El ABZ es un BZD del grupo de los metil carbamato, se formula como una suspensión para administración oral en bovinos y ovinos a la dosis

recomendada de 7,5 y 5 mg /kg, respectivamente. Está indicado para la eliminación y el control de un amplio espectro de parásitos helmintos, que incluyen: tenias (formas larvianas y adultos en neurocisticercosis e hidatidosis), nematodos abomasales e intestinales (adultos y estados larvales), y gusanos de pulmón (adultos y etapas larvales). Además, a 10 mg/kg (ganado vacuno) y 7,5 mg /kg (ovinos), es activo contra *Fasciola* adulta (>14 semanas de edad), la actividad ovicida también se ha demostrado 8 horas después del tratamiento (Riverie y Papich, 2018). Es eficaz frente a cepas resistentes de *Haemonchus contortus* a dosis altas (Alvarez et al., 2012). La estructura del ABZ es el éster metílico del ácido carbámico (5- (propylthio) - 1H - benzimidazol - 2 - il) (Dayan, 2003). Su fórmula molecular es C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S y su peso molecular es 265.34 (GlaxoSmithKline). Es relativamente insoluble en agua y en la mayoría de los disolventes orgánicos, haciendo que la absorción en el tracto gastrointestinal sea muy pobre. Después de la absorción, el ABZ se convierte rápidamente en el hígado al metabolito primario, ABZSO, que generalmente se considera que es la forma responsable de la actividad terapéutica del ABZ. ABZSO es conocido también como ricobendazole (RBZ). El ABZSO se metaboliza adicionalmente a ABZSO<sub>2</sub> y otros metabolitos oxidativos primarios y se excreta del cuerpo (Dayan, 2003).

### **2.3.1. Mecanismo de Acción**

El ABZ actúa sobre los parásitos a través de dos mecanismos: inhibiendo el metabolismo energético del parásito e inhibiendo la polimerización de la tubulina de los microtúbulos. Su unión a la tubulina durante el crecimiento de los microtúbulos provoca la inhibición de la mitosis (Lacey, 1990). Estos fármacos también presentan afinidad por la tubulina de los mamíferos. Aunque la afinidad

por la tubulina de los parásitos se haya mostrado superior a la de la tubulina de los mamíferos, es a este mecanismo de acción, al que se le atribuye el efecto teratogénico de los BZDs (Lacey, 1990). La pérdida de los microtúbulos citoplasmáticos conduce a la absorción deficiente de la glucosa por las fases larvarias y adultas de los parásitos. El gusano es entonces incapaz de mantener la producción de energía, lo que conduce a la inmovilización y eventual muerte. Una acción secundaria del ABZ podría ser la inhibición de la enzima fumarato reductasa, que es helmíntico-específica (Dayan, 2003).

### **2.3.2. Farmacocinética del ABZ**

No se ha establecido el alcance completo de la absorción del ABZ después de la administración oral, sin embargo, se sabe que el ABZ se absorbe poco y queda la mayor parte de la dosis oral en el tracto gastrointestinal. Se cree que la mala absorción se debe a su baja solubilidad acuosa. El ABZ experimenta rápidamente un extenso metabolismo de primer paso en el hígado, pero puede detectarse en el plasma. El ABZSO es el metabolito principal, se cree que es activo en la efectividad contra infecciones tisulares sistémicas. Las vidas medias plasmáticas de ABZ y ABZSO son aproximadamente 3 horas y 8.5 horas, respectivamente. El ABZ y sus metabolitos parecen ser principalmente eliminados en bilis, con solo una pequeña proporción que aparece en la orina (WHO, 2015). ABZSO se une en 70% proteína del plasma y se distribuye por todos los tejidos, incluidos fluido cerebroespinal. En vacunos, los residuos totales e leche fueron cerca de 5000 µg/kg a las 11 horas después de la administración de una dosis de 15 mg/kg p.v., reduciendo a 640 µg/kg después de 35 horas y 35 µg/kg después de las 72 horas. Los resultados en ovinos fueron muy similares (EMEA, 2004).

#### **2.3.4. Toxicidad del ABZ**

El ABZ presenta un amplio margen de seguridad como todos los BZDs. No está indicado para su uso durante la preñez temprana en vacas (45 días) y ovejas (30 días). El ABZSO es el principal producto presente en la sangre tras el tratamiento de animales con ABZ; estos tratamientos cuando se aplican a hembras durante el primer tercio de gestación han demostrado una alta actividad embriotóxica y teratógena, causando embriotoxicosis y numerosas malformaciones esqueléticas y vasculares a diversos niveles en los fetos (Cristófol et al., 1997, Hennessy et al., 1987). El ABZSO ha demostrado tener capacidad para interferir en la mitosis y consecuentemente causar malformaciones tal como se observó en embriones de terneras y ratas. La acción del ABZ y ABZSO sobre la polimerización de la tubulina también podría ser la causa de las malformaciones generadas por estos tratamientos. La embriotoxicidad y teratogenicidad del ABZ han sido también reportados (Teruel et al., 2009; Cristofol et al., 1997). El ABZ ha sido evaluado en terneros, ovinos, ratones y ratas, habiéndose observado cambios significativos en los sistemas inmunes de los animales, los neutrófilos segmentados se vieron particularmente afectados, siendo confirmado por los recuentos diferenciales de médula ósea. La hemoglobina, el hematocrito y los reticulocitos aumentaron en ratas y los recuentos de leucocitos se redujeron. Así mismo la elevación de enzimas hepáticas es un efecto secundario común con falla aguda hepática, causa supresión medular, agranulocitosis y anemia aplástica, la cual puede ser permanente (Carrara, 2005; EMEA, 1999; 2004a).

#### **2.4. Legislación Reguladora de Monitoreo de Residuos en el Perú**

La vigilancia de sustancias que pueden ser peligrosas para los consumidores y que pueden afectar a la calidad de los productos alimenticios está establecida en la legislación alimentaria para del Perú. Actualmente, la norma básica que recoge todas estas medidas en nuestro país, es la RESOLUCION DIRECTORAL N° 0050-2015-MINAGRI-SENASA-DIAIA, Plan Anual de Monitoreo de Residuos Químicos y Otros Contaminantes en Alimentos Agropecuarios Primarios y Piensos, para el periodo abril 2015 a marzo 2016. En el Perú la ley de inocuidad alimentos establece que ante la ausencia de LMR nacionales establecidos, asume los LMR del Codex Alimentarius; así mismo esta ley ha establecido tres autoridades nacionales competentes en inocuidad alimentaria: La Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA) del Ministerio de Salud en alimentos procesados industrialmente, el Instituto Tecnológico Pesquero (ITP) del Ministerio de Producción en alimentos de origen marino y el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) del Ministerio de Agricultura en alimentos de producción y procesamiento primario (D.S N° 034-2008-AG) (Gómez, 2014).

#### **2.5. Límite Máximo de Residuos (LMR)**

Los medicamentos veterinarios se usan para garantizar la salud y el bienestar de los animales, sin embargo, los beneficios de la administración de medicamentos a los animales de granja utilizados para la producción de alimentos, también están acompañados por los riesgos asociados a la presencia de los residuos de medicamentos en los productos de los animales tratados (Boeckman y Carlson., 1995). Los medicamentos antimicrobianos, los promotores del crecimiento, los sedantes, los anticoccidiales, los

antiinflamatorios no esteroideos y los antihelmínticos son los principales medicamentos veterinarios que potencialmente contaminan los alimentos (Beyene, 2016). Los residuos se definen como sustancias químicas o metabolitos de los medicamentos que pueden acumularse dentro de los tejidos o productos comestibles de los animales tratados ((European Commission-EC. 2012). Estos residuos pueden ser el resultado de un uso inapropiado de las drogas o extra etiquetado, falta de mantenimiento del medicamento, períodos de retiro inadecuados o malas prácticas de producción ganadera (Tajick y Shohreh, 2006). Con el fin de proteger la salud de los consumidores es indispensable realizar una evaluación de seguridad para estas sustancias teniendo en cuenta sus rasgos toxicológicos, la contaminación ambiental y sus efectos farmacológicos. Una sustancia farmacológicamente activa sólo se podrá emplear en animales productores cuando se haya realizado una evaluación de riesgo, con sólida base científica y resultados favorables. Se establecen los LMR para una sustancia, cuando se considera necesario proteger la salud humana (Codex Alimentarius, 2012). Para fijar los LMR se tendrán en cuenta las características toxicológicas del producto y su uso será en base a buenas conductas de prácticas veterinarias, resultados de ensayos de depleción etc. Todos estos estudios servirán para poder fijar el periodo o tiempo de espera en las autorizaciones de comercialización de los medicamentos, es decir, el tiempo que debe transcurrir desde la administración del fármaco hasta el sacrificio del animal. El Codex Alimentarius (2012) ha establecido los LMRs en tejidos, vísceras y leche del TCBZ: Músculo 150 µg/kg, hígado 200 µg/kg, riñón 100 µg/kg, grasa 100 µg/kg, ABZ en leche, 100 µg/kg, Fenbendazol en leche 100 µg/kg; Tras una revisión científica por parte de la European Medicinal Agencia, Comité de Medicamentos Veterinarios (CVMP)

estableció LMR provisionales para residuos en la leche bovina y ovina de TCBZ de 10 µg/kg (Kinsella et al., 2009; EMEA, 2014; European Commission, 2014).

## **2.6. Tiempo de Retiro**

El tiempo de retiro es el intervalo de tiempo necesario para que el residuo potencialmente tóxico, alcance una concentración inocua. También se refiere al tiempo transcurrido desde que se suspende la medicación de un animal hasta que se permite su sacrificio o utilización de un subproducto. Los tiempos de retiro varían para cada preparación farmacéutica y también pueden variar en las distintas especies. Los fabricantes de medicamentos, están obligados a presentar datos sobre residuos tisulares y velocidad de eliminación tisular de todos los nuevos preparados farmacológicos para uso animal (de consumo), así como un método de detección de residuos. Estos datos no sólo son necesarios para conocer las concentraciones de los medicamentos en los tejidos comestibles, sino también para establecer cuándo se reducen los residuos tisulares hasta niveles tolerables o hasta qué concentración son detectables. Si las concentraciones residuales en tejidos comestibles superan las aceptadas, se aplica un período de suspensión (Davicino, 2002). La evaluación de la velocidad de eliminación de un medicamento se inicia con su estudio metabólico que suelen hacerse paralelamente con los residuales. Para identificar las rutas metabólicas y establecer la distribución tisular y la presencia de residuos en los tejidos suelen utilizarse medicamentos marcados con isótopos. Se debe disponer de datos de eliminación por orina, sangre, bilis y de tejidos comestibles como hígado, riñón, músculo esquelético, corazón y tejido adiposo (Gimeno, 1997). Los tiempos de retiro se determinan en función del perfil cinético de la eliminación tisular de los fármacos (inalterado y/o metabolitos), que no sea superior a su

correspondiente LMR, siendo necesario establecer este tiempo de espera. (Codex Alimentarius, 2012).

## **2.7. Métodos para la Detección de Residuos de BZD**

Se han desarrollado varios métodos analíticos para detectar residuos antihelmínticos en la leche usando un rango de tecnologías desde ELISA (Brandon et al., 2002), SPR-biosensor (Surface Plasmon Resonance-biosensor (Keegan et al., 2009), HPLC, HPLC-UV (fluorescence method), DAD (diode array detector) y FLD (fluorescence detector) a LC-MS, LC-MS/MS o recientemente, UHPLC-MS/MS (ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry) (Whelan et al., 2010). Las técnicas de cromatografía de gas (CG) y las de espectrometría de masa (MS), cumplen las exigencias en relación a la detección de niveles muy bajos de residuos (Límite de cuantificación entre 2-5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), éstas son técnicas confirmatorias, lo que permite que estas tecnologías sean esenciales en los procedimientos habituales de confirmatoriedad para la detección de residuos de fármacos. Estos métodos han sido reportados para la determinación de fasciolidas y/o en combinación con otros BZDs o residuos de LM (De Ruyck et al., 2002; Danaher et al., 2007; Kinsella et al., 2009; Kaufmann et al., 2011).

Algunos de los métodos antes mencionados implican largos, trabajosos y costosos métodos de extracción que generan abundantes cantidades de desechos solventes (Kinsella et al., 2009). Para simplificar estos procedimientos, se desarrolló un nuevo método para la preparación de muestras de residuos de plaguicidas en frutas y vegetales denominado QuEChERS (por sus siglas en inglés de rápido, fácil, barato, efectivo, resistente y seguro) (Anastassiades et al., 2003), y que, desde su inicio es una metodología adoptada por los laboratorios

que se ha utilizado con éxito para analizar cientos de pesticidas en una variedad de alimentos (Kinsella et al., 2009).

El método LC-MS/MS se ha validado de acuerdo a las directrices necesarias requeridas para Programas de Supervisión de la UE con el CE/2002/657. Este método detectó 38 residuos de las drogas antihelmínticas más usadas (incluido nueve fasciolícidas) en muestras biológicas. Los factores investigados incluyeron la recuperación, selectividad, precisión, linealidad y los límites analíticos, incluidos los límites de decisión (CCa) y la capacidad de detección (CCb) del método (Kinsella et al., 2009; De Ruyck et al., 2002; Lucas y Olivos, 2010; Lucas, 2016; Joint FAO/IAEA, 2016).

El Centro de Control de Insumos y Residuos Tóxicos del Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú (SENASA) respecto a la detección de residuos tóxicos en alimentos ha desarrollado y validado los métodos correspondientes, la técnica de LC-MS/MS, la cual es la técnica confirmatoria estándar de elección para la detección y cuantificación de residuos pesticidas y medicamentos veterinarios en alimentos (Lucas, 2016), la misma que ha sido recomendada por la organización mundial Joint FAO/IAEA, 2016.

## **2.8. Evaluación Immunotoxicológica**

### **2.8.1 Fasciolosis y *Fasciola hepatica***

La Fasciolosis se produce cuando el huésped definitivo (mamíferos herbívoros o humanos) ingieren los quistes o metacercarias infecciosas de los trematodos digeneicos de la familia Fasciolidae, el género *Fasciola* con dos especies, *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica*. Estos son parásitos platelmintos en forma de hoja que infectan el hígado y las vías biliares de su

huésped y que pueden medir hasta 30 mm de longitud (Schmidt y Roberts, 2000; Taylor et al., 2007). Las dos especies de *Fasciola* son hermafroditas, bilateralmente simétricas y en forma de hoja que requieren un caracol del género *Lymnaea* como un huésped intermediario. *F. hepatica* es de color marrón grisáceo con una parte frontal cónica que es marcado por el ensanchamiento distintivo del hombro y un extremo posterior puntiagudo (Radostits et al., 2007; Taylor et al., 2007). La distribución geográfica varía entre estas dos especies, donde *F. hepatica* es omnipresente en todas las regiones (Mas-Coma et al., 2005) y *F. gigantica* se limita a las regiones ecuatoriales y tropicales en América, África, Oriente Medio, Europa oriental y Asia meridional y oriental (Torgerson y Claxton, 1999; Taylor et al., 2007). Se cree que la amplia distribución de *F. hepatica* es, en parte, causada por su adaptabilidad a diferentes caracoles Lymnaeidos (Lotfy et al., 2008). En el Perú, *F. hepatica* es el agente causal de la fasciolosis bovina, ovina, caprina y otros animales domésticos, además de ser una importante causa de decomiso en camales, es una enfermedad parasitaria, que, aunque no ocasiona alta mortalidad de los animales, provoca debilitamiento y atraso en su desarrollo, lo que se expresa en una baja en la productividad en muchos predios ganaderos (Espinoza et al., 2010). Esta parasitosis hace que el uso de antihelmínticos sea frecuente en programas de desparasitación en masa (Taylor, 2000).

**2.8.1.1. Ciclo de Vida.** - El ciclo de vida, descrito por primera vez por Thomas en 1883 involucra a un caracol, hospedero intermediario del género *Lymnaea* (Claxton et al., 1988) y es resumido en la Figura 2.

1.- Pasaje de huevos del tracto digestivo del huésped definitivo al medio ambiente y su posterior embrionación y desarrollo. La *F. hepatica* adulta elimina huevos

en los conductos biliares y el duodeno. Los huevos salen del intestino de los hospedadores definitivos en las heces en un estado no desarrollado (Urquhart et al., 2001). La embrionación y el desarrollo de los huevos solo se producen cuando se liberan los huevos de las heces. Dicha liberación se ve facilitada por la humedad que disuelve las heces y la propagación mecánica de las heces por parte de animales u otros (Soulsby, 1982). El desarrollo tiene lugar a temperaturas entre 10 y 30°C.

2.- Los huevos embrionados liberan los miracidios y se inicia la búsqueda activa del huésped intermediario, generalmente un molusco gasterópodo, usualmente del género *Lymanea spp.* Una vez libres del huevo, los miracidios son muy activos, tienen aproximadamente 24 horas para infectar a un huésped, durante el cual no se alimentan, sino que dependen de las reservas de energía de glucógeno finito. Son muy fototrópicos, una adaptación para encontrar caracoles hospedadores intermedios dentro de sus hábitats (Soulsby, 1982).

3.- El huésped Intermediario. Localización e infección de un caracol adecuado, huésped intermediario, *Lymanea spp.* La penetración miracidial del caracol es un proceso complejo que involucra la adhesión de la papila miracidial anterior y la secreción de enzimas proteolíticas (Smyth y Halton, 1983).

4.- Desarrollo y multiplicación de *F. hepatica*, de miracidios a esporocistos, redias y cercarias dentro del huésped intermediario. El desarrollo de miracidium a metacercaria puede tomar un mínimo de 6 a 7 semanas bajo condiciones de campo favorables, aunque en condiciones desfavorables, puede ser necesario un período de varios meses (Urquhart et al., 2001; Taylor et al., 2007). La infección de un caracol con un miracidio puede producir más de 600 metacercarias (Urquhart et al., 2001).

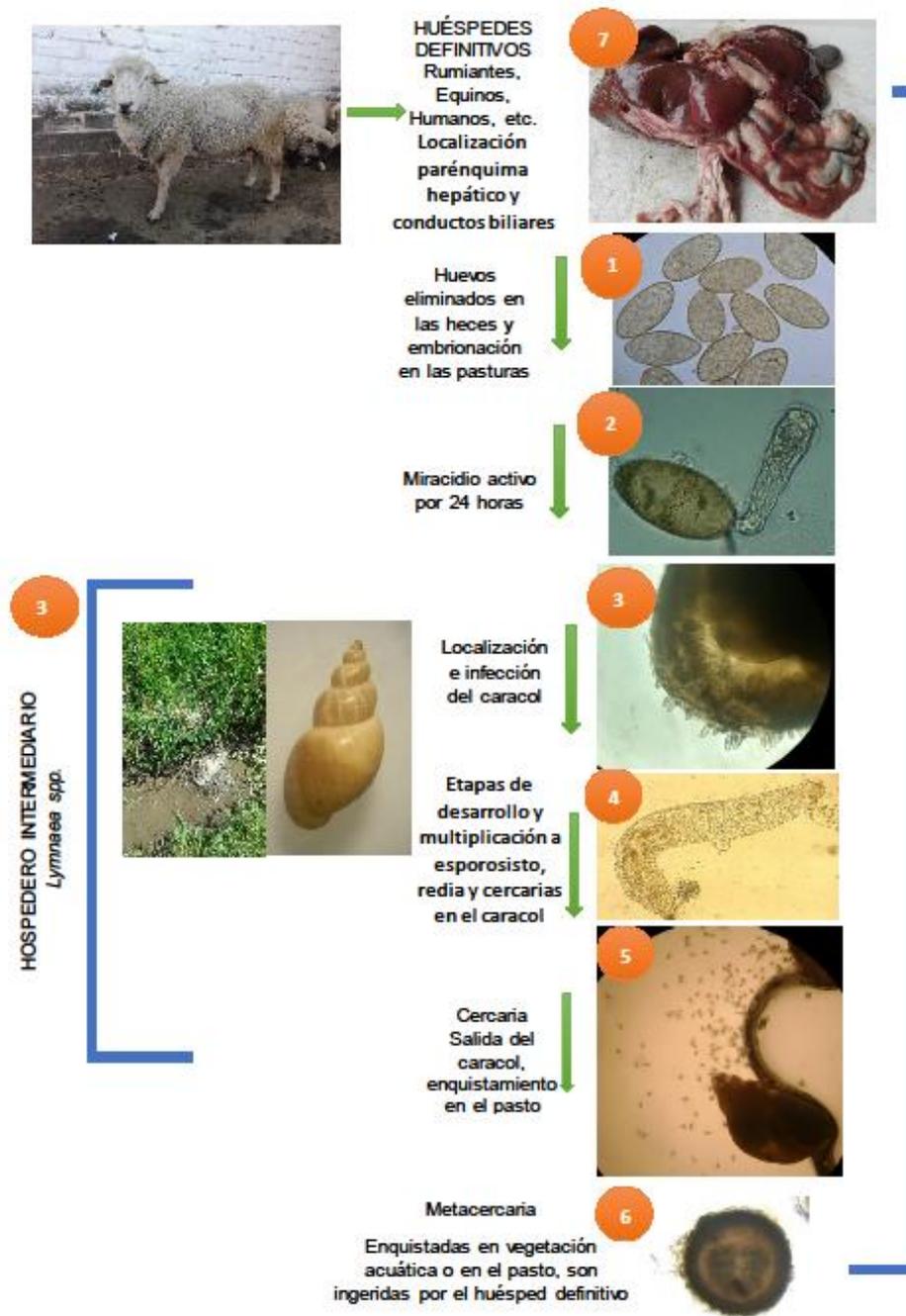
5.- Salida de la cercaria de los caracoles y su enquistamiento en el medio ambiente.

6.- Metacercaria, la etapa infectiva enquistada principalmente en las pasturas. Las metacercarias permanecen viables por más de 1 año, pero la infectividad disminuye a una tasa rápida inversamente proporcional a la humedad y temperatura disponibles (Soulsby, 1982, Taylor, 2007).

7. Ingestión de las metacercarias infecciosas, desenquistamiento en el huésped definitivo, migración hacia el hígado y desarrollo hasta la edad adulta. Las metacercarias son ingeridas por el huésped definitivo mamífero, las fasciolas juveniles recién desenquistadas se dirigen al hígado y al sistema de conductos biliares desarrollando a adultos quienes eliminan huevos y el ciclo continúa (CDC, 2013). Los humanos pueden infectarse al ingerir plantas de agua dulce que contienen metacercarias, especialmente berros (CDC, 2013). Tras la ingestión por el huésped definitivo, la metacercaria es desenquistada en el intestino delgado de donde las fasciolas jóvenes migran a través del peritoneo y penetran la cápsula del hígado, migrando por el parénquima hepático durante 4 a 8 semanas (Urquhart et al., 2001; Radostits et al., 2007), creciendo de 0.1 a 10 mm, antes de ingresar a los conductos biliares donde maduran, y comenzar la puesta de huevos en aproximadamente 9 a 12 semanas después de la infección (Soulsby, 1982; Radostits et al., 2007; Taylor et al., 2007). Las fasciolas adultas llegan a los conductos biliares, maduran y excretan los huevos a la bilis y posteriormente a las heces. La fasciola adulta mide hasta 30 mm de largo por 13 mm de ancho, tiene forma de hoja y tiene dos ventosas: la ventosa oral rodea la boca y la ventosa ventral está aproximadamente a un tercio del cuerpo. el tegumento está cubierto de espinas puntiagudas, la fasciola está

característicamente repleta de ciegos y testículos ramificados (Soulsby, 1982). Una sola fasciola puede producir hasta 20,000 huevos por día (Fairweather, 2009). Las migraciones aberrantes a otros órganos son más comunes en el ganado e incluyen la infección del páncreas, los pulmones y el timo.

**Figura 2.** Esquema del Ciclo biológico de *F. hepatica*.



## 2.8.2 Respuesta inmunitaria frente a *F. hepática*

La infección por *F. hepática* induce enfermedad aguda, crónica o subclínica en ovejas y vacas. Las ovejas son más susceptibles a la infección que los bovinos y son muy sensibles tanto a las infecciones naturales como a las experimentales (Beesley et al., 2018; Ruiz-Campillo et al., 2017). Los ovinos con frecuencia mueren de fasciolosis aguda, mientras que algunas infecciones pueden durar hasta 11 años. *Fasciola* puede afectar a una amplia gama de especies tanto domésticas como silvestres, así como a los seres humanos, la respuesta inmune y la resistencia a la reinfección son bastante variables en los diferentes huéspedes. Mientras que las ratas y el ganado vacuno desarrollan una resistencia parcial, las ovejas, los ratones y las cabras son muy sensibles (Haroun y Hillyer, 1986; Martínez-Moreno et al., 1997). La susceptibilidad o resistencia relativa del huésped a la infección con *Fasciola spp.* se asocia con las características bioquímicas de los parásitos y la respuesta inmune del huésped durante la infección (Keegan y Trudgett, 1992; Mulcahy et al., 1999; Spithill et al., 1999). Por lo tanto, en muchas especies el parásito tiene mecanismos eficientes de evasión inmunitaria, que pueden incluir la liberación de factores inmunosupresores que suprimen la respuesta proliferativa de los linfocitos T en ratas (Cervi y Masih, 1997), ovinos (Chauvin et al., 1995) y cabras (Martínez-Moreno et al., 1997).

Se ha demostrado que *fasciola* puede mediar su supervivencia en el hospedero a largo plazo a través de la regulación y la modulación del SI, alterando la homeostasis inmunitaria del huésped y/o influyendo en la microbiota intestinal particularmente con respecto a infecciones concurrentes con otros patógenos como *Salmonella dublin*, *Mycobacterium bovis* (Flynn et al., 2009; Claridge et al., 2012; Cwiklinski et al., 2016). En general, se ha establecido que en la infección

por helmintos en términos de respuestas de células T, la activación de una respuesta Th2 se correlaciona con enfermedad (McSorley et al., 2013; Maizels y McSorley, 2016) con una posterior regulación a la baja de las respuestas Th1. No está claro si la respuesta Th2 proporciona inmunidad protectora contra los parásitos invasores, o son responsables de la patología inmune relacionada, o ambos (Allen y Maizels, 1996). Casi todas las facetas del sistema inmunitario se modifican o incluso se recalibran, y los individuos infectados muestran un estado de baja respuesta inmune que puede considerarse una forma de tolerancia inmunológica (Maizels y McSorley, 2016). Trabajos realizados en ovinos infectados con fasciola (Pleasance et al., 2011; Mulcahy et al. 1999; Hacariz et al., 2009; Mendes et al., 2013) sugieren que las respuestas Th1 ocurren durante las primeras etapas de la infección, para luego ser reguladas negativamente, mientras que posteriormente la respuesta TH2 es regulada positivamente, con la inhibición concomitante de respuestas protectoras pro inflamatorias a medida que la enfermedad progresa a cronicidad, lo que le permite al parásito sobrevivir en el huésped.

La infección por *F. hepatica* en ovinos induce una respuesta Th2 polarizada, relacionada con la producción de IL-4 (Waldvogel et al. 2004; Viillard et al., 1999) y con una temprana respuesta Th1 con producción de IFN- $\gamma$  (Tliba et al., 2002). Cuando la respuesta Th1 va disminuyendo, las citoquinas de perfil Th2 aumentan y esto supone una reducción en la carga parasitaria (O'Neill et al., 2000; Moreau y Chauvin, 2010). Martínez-Pérez et al. (2014) llevaron a cabo un estudio donde se confirmó que los valores de IL-4 respecto a IFN- $\gamma$  fueron más altos en la semana 4 y 12 p.i., corroborando que una respuesta Th2 es la que permanece a lo largo de la infección, de acuerdo a trabajos previos

de Pleasance et al. (2011a) y Hacariz et al. (2009), según lo mencionado por Robles-Pérez et al., (2015).

**Alteraciones hemáticas:** Las manifestaciones patológicas en la fasciolosis dependen del número de metacercarias ingeridas (Mehlhom y Armstrong, 2001; Coop y Kryziakis, 2001; Wiedosari et al., 2006), sin embargo, el común de los hallazgos hematológicos en todos los tipos de fasciolosis incluyen anemia, hipoalbuminemia y eosinofilia (Radostits et al., 2007). La fasciolosis puede provocar pérdidas significativas de sangre con todas las consecuencias asociadas (Soun et al., 2006), la anemia hemorrágica es el principal factor que contribuye a la morbilidad y mortalidad del hospedador. Una anemia severa es observada en ovejas, pero es menos marcada en el ganado vacuno (Soulsby, 1982). Se estima que la cantidad diaria de sangre que se pierde por fasciola oscila entre 0.2 y 0.5 ml (Holmes et al., 1968; Taylor et al., 2007). Cordero del Campillo y Rojo Vázquez (1999) indican que en la fasciolosis crónica la anemia es hipocrómica y macrocítica, como lo manifestado en el estudio de Martínez-Valladares et al. (2010). Los valores normales de glóbulos rojos, hematocrito y hemoglobina deberían oscilar entre  $9-15 \times 10^6/\mu\text{l}$ , 27-45% y 9-15g/dl, respectivamente (Schalm et al., 2010). Sin embargo, en una infección natural, se describieron valores de glóbulos rojos y hemoglobina por debajo del umbral mínimo (Martínez-Valladares et al., 2010a). Se obtuvieron valores en animales infectados experimentalmente dentro del rango de normalidad para los tres parámetros, aunque fueron disminuyendo a medida que avanzaba la infección (Martínez-Pérez et al., 2013; Robles-Pérez et al., 2015).

Respecto a las poblaciones leucocitarias, con valores normales dentro de  $4-8 \times 10^3$  por  $\mu\text{l}$  (Schalm et al., 2010), lo más resaltante es una marcada eosinofilia tras la infección, que se incrementa en la fase parenquimatosa y persiste en altos niveles cuando el parásito penetra en los conductos biliares (Ross, 1966; Sinclair, 1975; Poitou et al., 1993; Mekroud et al., 2007). Los eosinófilos se encuentran recubiertos de IgE e IgG y son ricos en gránulos de histamina que vierten al exterior produciendo fuertes respuestas inflamatorias para posteriormente los neutrófilos encargarse de la fagocitosis y destrucción de patógenos (Robles-Pérez et al., (2015). La eosinofilia, definida como un recuento periférico superior a 450 células por microlitro, se asocia con infestación parasitaria, inflamación alérgica, infecciones y reacciones a los medicamentos (Fulkerson y Rothenberg, 2013; Roland et al., 2014); mientras que una condición que resulta de un número inferior al normal, o eosinopenia, se asocia con las fases tempranas de la enfermedad infecciosa. Los basófilos tienen capacidades de modulación inflamatoria similares, pero no son verdaderos fagocitos. La basofilia, se ha relacionado con hiperlipidemia e infecciones parasitarias (Roland et al., 2014). También se puede observar un aumento de linfocitos, neutrófilos y, ocasionalmente, monocitos y basófilos (Behm y Sangster, 1999). Martínez-Valladares et al. (2010) y Martínez-Pérez et al. (2013), confirmaron estos valores superiores al rango normal tras la infección (Robles-Pérez et al., 2014a).

### **2.8.3. Parámetros de Evaluación Immunotoxicológica**

Los parámetros que deben ser evaluados rutinariamente en estudios toxicológicos para determinar los efectos de una droga sobre el SI se clasifican en cinco categorías de efectos adversos que pueden producirse sobre el sistema inmunológico:

1. Inmunosupresión: efectos sobre el SI que resultan en una disminución de la inmunidad. 2. Inmunogenicidad: Reacciones inmunológicas que se expresan por una droga y/o sus metabolitos. 3. Hipersensibilidad: Sensibilización inmunológica debido a una droga y/o sus metabolitos. 4. Autoinmunidad: Reacciones inmunes a antígenos propios. 5. Inmunoestimulación Adversa: Activación de mecanismos efectores del SI. La fenotipificación inmune celular puede llevarse a cabo mediante citometría de flujo o análisis inmunohistoquímico. Las determinaciones del fenotipo de las superficies celulares pueden llevarse a cabo utilizando tejido obtenido en la necropsia (por ejemplo, esplenocitos, timocitos, médula ósea, células de nódulos linfáticos) o en células sanguíneas circulantes de los animales en estudio o en la necropsia. El análisis puede incluir células T (por ejemplo, CD3, CD4, CD8), células B, células NK, macrófagos y sus marcadores. Aunque la determinación del fenotipo de células inmunes no se considera generalmente adecuado para evaluar como único método de evaluación sobre los efectos del fármaco sobre la función inmune, esto puede ser un indicador útil de la inmunosupresión por dos razones: (1) los cambios inmunológicos del fenotipo celular (determinada por citometría de flujo) se correlacionan significativamente con la disminución de la resistencia del huésped frente a patógenos y/o tumores y (2) la citometría de flujo pueden ser utilizados eficazmente para supervisar efectos adversos en ensayos clínicos (Selgrade et al., 1995). En la citometría de flujo se han desarrollado técnicas que se pueden utilizar para evaluar los efectos de los fármacos sobre parámetros inmunes funcionales (Bick, 1982; Burchiel et al., 1999). Los datos obtenidos de numerosos estudios en roedores han demostrado la resistencia del huésped después de la exposición aguda o crónica a xenobióticos (Dean y Murray, 1991), ej. el tratamiento con FBZ

altera numerosos parámetros inmunes en roedores incluyendo mielosupresión, inducción y alteración en las respuestas de células T y B. los ensayos de función auxiliar de células T, la citotoxicidad no se vio afectada en ratones BALB/c tratados durante 2 semanas con 100 ppm FBZ; en contraste, FBZ a 10 mg/kg en ratones C57BL/6 dio como resultado un aumento de la proliferación de células de bazo a los mitógenos (Cray, 2008).

#### **2.8.4. Tratamiento y Resistencia antihelmíntica de la Fasciolosis**

A pesar de que hay métodos disponibles para manejar la fasciolosis en el ganado, muy pocos adoptan el tratamiento de control a través de métodos alternativos que incluyen el cuidado del medioambiente, como la limpieza de acequias, cultivo de pasturas y riegos alternativos, empleo de plantas medicinales, etc. La fasciolosis comúnmente se controla tratando a los animales infectados con antihelmínticos fasciolicidas específicos (Torgerson y Claxton, 1999). En base a su estructura química, las drogas fasciolicidas se pueden clasificar en varios grupos:

- 1) hidrocarburos halogenados (tetracloruro de carbono, hexacloroetano, etc);
- 2) compuestos bisfenólicos (hexaclorofeno, bitionol), etc.
- 3) compuestos nitrofenólicos (nitroxinil, disofenol, niclofolan);
- 4) salicilanilidas (closantel, rafoxanida, oxiclozanida) y salicilanilidas bromadas.
- 5) bencenesulfonamidas (clorsulon);
- 6) benzimidazol (ABZ, netobimina, luxabendazol) y bencimidazol halogenado (TCBZ);
- 7) fenoxialcanos (diafetemida). Estos antihelmínticos difieren en eficacia, precio, seguridad y la etapa de parásito a la que se dirigen, como se resume en el cuadro 1 (Riviere y Papich, 2018). Estos químicos dejan residuos en la carne y la leche

de los animales tratados y, por lo tanto, pueden tener largos períodos de espera (hasta 65 días) que impiden su venta para el consumo humano durante este tiempo.

**Cuadro 1.** Eficacias comparativas de los compuestos antitrematodos más utilizados contra las diferentes etapas de la *F. hepatica*. Fuente: Fairweather 1999, citado por Riviere y Papich (2018).

Drogas Fasciolicidas	Edad de las Fasciolas (en semanas)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
DIAMPHENETIDE	90 - 100%						50 - 80%					
TRICLABENDAZOLE	90 - 99%		99 - 100%									
RAFOXANIDE				50 - 90%			91 - 99%					
CLOSANTEL							50 - 90%		91 - 99%			
NOTROXYNIL							50 - 90%		91 - 99%			
CLORSULON (oral)									90 - 99%			
CLORSULON (SC)									70 - 99%			
ALBENDAZOLE									70 - 99%			
OXYCLOZANIDE									70 - 99%			

El TCBZ, ha sido el fármaco de elección predominante para el tratamiento de las infecciones de trematodos hepáticos durante más de 20 años (Brennan et al., 2007). Esto se debe en gran parte a que es efectivo contra las etapas tempranas inmaduras y adultas del parásito, mientras que la mayoría de los otros flukicidas solo muestran actividad contra las etapas posteriores, tal como se resalta en el cuadro 1 (Fairweather y Boray, 1999). En la década de 1990, la primera evidencia de poblaciones de duelas resistentes a TCBZ se informó en Australia, poco más de una década después de que se introdujera esta clase de drogas (Overend y Bowen, 1995). Se han reportado prevalencias de resistencias en 11 países en ovinos, vacunos y humanos, en todo el mundo (Kelley, 2016). Igualmente, en Cajamarca, se ha demostrado la resistencia del parásito al TCBZ (Rojas, 2012; Ortiz et al., 2013), por lo tanto, es crítico un manejo efectivo de la droga para una producción ganadera sostenible en zonas prevalentes al parásito.

La mayoría de los informes sobre resistencia al uso de fasciolicidas emplea el método de FECRT como herramienta de diagnóstico para determinar la eficacia *in vivo* en ovinos, este método estima la eficacia antihelmíntica comparando el recuento de huevos en heces de los animales antes y después del tratamiento. Para demostrar resistencia, los resultados del FECRT deben corroborarse utilizando una prueba de eficacia controlada *in vivo* (Coles et al., 1992; Coles et al., 2006). El método de FECRT es el más difundido en todo el mundo ya que puede ser utilizado en las diferentes especies de herbívoros y resulta seguro para determinar la susceptibilidad o resistencia a todos los tipos de antihelmínticos bajo condiciones de campo. En general se asume que reducciones inferiores al 90 o 95% dependiendo del herbívoro, del antihelmíntico, etc. y con intervalos de confianza al 95% cuyos límites inferiores son menores al 90% son indicativos de Resistencia Antihelmíntica (Coles et al., 1992; Flanagan et al., 2011; Daniel et al., 2012). La prueba es simple, económica y accesible, igualmente ésta prueba se emplea para la detección de resistencia antihelmíntica de nemátodos (Coles et al., 1992), pero las limitaciones de la prueba incluyen la incapacidad de medir la eficacia del fármaco en la etapa de infección previa a la patente y el potencial de reportar cuentas de huevos falsas debidas a la liberación de huevos de fasciola almacenados en la vesícula biliar del huésped, incluso después de la eliminación de los parásitos después de un tratamiento farmacológico exitoso (Mitchell et al., 1998).

## CAPÍTULO III

### DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS

#### 3.1 Hipótesis de Investigación

Los niveles de metabolitos de TCBZ y ABZ encontrados en la leche bovina comercializada en Cajamarca exceden los LMR permisibles recomendados y la exposición al TCBZ causa alteraciones en los niveles de eritrocitos, hematocrito, leucocitos, de las subpoblaciones linfocitarias CD4 y CD8 y la expresión de citoquinas IL4 e IFN $\gamma$  en linfocitos T de sangre periférica de ovinos infectados con *F. hepatica*.

#### 3.2. Diseño Metodológico

La detección de los metabolitos de TCBZ y ABZ corresponde a una investigación básica, no experimental. En la evaluación de los efectos sobre la respuesta celular del TCBZ en ovinos, la investigación fue de tipo experimental, ya que se manipuló una variable independiente (tratamiento *in vivo* con TCBZ), con dos grupos de repeticiones experimentales.

##### 3.2.1. Localización

El estudio se llevó a cabo en la ciudad de Cajamarca, provincia y departamento de Cajamarca, situada en la zona noroeste del Perú, a 2720 msnm de altitud. Sus coordenadas geográficas son 07° 09' 12" latitud sur y 78° 30' 57" longitud oeste. La parte experimental se desarrolló en el Laboratorio del Centro de Control de Insumos y Residuos Tóxicos del Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú y en el Laboratorio de Inmunología e Investigación de la Facultad de Ciencias Veterinarias – Universidad Nacional de Cajamarca.

### **3.2.2. Universo, selección y toma de muestras**

#### **3.2.2.1. Para la detección de metabolitos de TCBZ y ABZ residuales en leche**

La parte experimental se realizó en el laboratorio del Centro de Control de Insumos y Residuos Tóxicos del Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú (SENASA). Se analizó un total de 30 muestras de leche fresca, 300 ml por muestra, según lo requerido por el laboratorio, las cuales fueron recolectadas de 9 puntos de venta de leche en la zona comercial de expendio al público dentro del perímetro urbano de la ciudad de Cajamarca. Las muestras fueron recolectadas previa zonificación de las áreas de mayor comercialización. Se siguieron las Normas y Recomendaciones para la recolección, registro y seguimiento de la Cadena de Custodia de la Oficina de Centros de Diagnóstico y Producción (CIRT). Control de Insumos y Residuos Tóxicos del Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú (SENASA) - Lima. Se realizó una encuesta de procedencia y la correcta identificación a lo largo de todo el proceso de la toma de muestras, se realizó el almacenamiento a  $-70^{\circ}\text{C}$ , el envío y transporte en caja de tecknopor aislante con refrigerantes para su procesamiento para ser analizadas por residuos de TCBZ y ABZ. Se verificó la temperatura correcta requerida al momento de la recepción de las muestras en el CIRT- SENASA. Para el número de muestra se realizó un muestreo aleatorio considerando una frecuencia de casos de acuerdo a las recomendaciones según Cuadro 2 para casos de incumplimiento esperado en la población (Codex Alimentarius, 2010).

**Cuadro 2.** Número de muestras requerido para detectar por lo menos un resultado fuera de cumplimiento con probabilidades predefinidas (90, 95 y 99 por ciento) en población con frecuencia de incumplimiento conocida.

Frecuencia de casos fuera de cumplimiento (% en una población)	Mínimo número de muestras para detectar un resultado fuera de cumplimiento con un nivel de confianza del:		
	90%	95%	99%
35	6	7	11
30	7	9	13
25	9	11	17
20	11	14	21
15	15	19	29
10	22	29	44
5	45	59	90
1	230	299	459
0.5	460	598	919
0.1	2302	2995	4603

*Fuente:* Comisión del Codex Alimentarius. Métodos de Análisis y Toma de Muestras. ALINORM 08/31/31

### 3.3. Metodología experimental para la detección de metabolitos de TCBZ y ABZ

La detección de los metabolitos de TCBZ y ABZ se realizó mediante la técnica de LC-MS/MS por sus siglas en inglés Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry/Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem, es una técnica confirmatoria estándar de elección para la detección y cuantificación de residuos pesticidas y medicamentos veterinarios en alimentos. Las condiciones para el análisis por LC/MS/MS se realizaron según protocolo de Kinsella et al. (2009) y Lucas (2016).

#### 3.3.1. Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem (LC-MS/MS)

##### 3.3.1.1. Reactivos y muestras:

- Disolventes: acetonitrilo y metanol (MeOH) grado HPLC.
- NaCl y acetato de amonio (grado analítico).

- Solvente primario secundario de amino (PSA) (40  $\mu\text{m}$ , Grado analítico), carbón negro grafitizado (GCB).
- $\text{C}_{18}$  más 150 mg de sulfato de magnesio anhidro ( $\text{MgSO}_4$ )
- $\text{MgSO}_4$ :  $\text{NaCl}$  (4:1, p/p).
- Agua purificada y estándares.

Las muestras a investigar fueron recolectadas de puntos de comercialización de leche fresca en mercados y paradas del distrito, provincia de Cajamarca.

### 3.4. Equipos:

- Sistema LC-MS/MS: Waters Quattro Premier™ XE.
- Desgasificador al vacío
- Horno de columna
- Equipo de muestreo automático API3000 tándem cuadrupolo MS con una interfaz de ionización por electrospray y una válvula de desvío colocada entre la columna y la fuente. Quattro Premier™ XE, Waters Corporation.
- Centrífuga Sorvall Legend RT (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA),
- Mini-centrífuga Hill Scientific mv13
- Vortex Daigger 2 (Vernon Hills, IL, USA.).

Tanto el HPLC como el Quattro Premier™ XE fueron controlados con MassLynx 4.1 (Waters) y la cuantificación se realizó por medio de QuanLynx (Waters).

### 3.5. Cromatografía Líquida

Se usó una modificación simple del método QuEChERS para la extracción de los analitos de las muestras de leche. Este método incluye la extracción de los analitos con acetonitrilo ( $\text{MeCN}$ ) en presencia de  $\text{MgSO}_4$  y  $\text{NaCl}$  para la

separación de fases, seguido de una extracción de fase sólida dispersiva con una mezcla de sulfato de magnesio y C18. La separación de fase inversa de los analitos se realizó a 30 °C en una columna Prodigy™ C<sub>18</sub> (150mm×3mm I.D, partículas de 5µm) protegida por una columna de protección C<sub>18</sub>(4 mm x 3 mm I.D.), ambos de Phenomenex (Torrence, CA, USA). Las condiciones de la fase móvil final fueron (A) formato de amonio acuoso 25 mM a pH 4 y (B) 12,5 mM de formiato de amonio en MeCN: MeOH (50:50, v/v).

Se utilizó un gradiente de la elución (0,3 ml min<sup>-1</sup>) con una condición de partida inicial de 98:2 (A:B, v/v) y la concentración orgánica aumentó hasta 100% durante 5 min, donde se mantuvo durante 10,5 min antes de volver a la condición inicial de partida.

### **3.6. Espectrometría de masas**

El análisis de EM se realizó mediante ionización a presión atmosférica para electrospray en los modos positivo (ESI +) y negativo (ESI-) aplicados en inyecciones secuenciales usando las mismas condiciones LC. Las condiciones de MS se optimizaron mediante la infusión de una solución estándar de 1 µg/ml de cada analito y el monitoreo de los dos iones de fragmentos más abundantes producidos a partir del ion molecular. Los parámetros de ionización fueron: ESI Positivo, temperatura de la fuente: 120 °C, temperatura de desolvatación: 350 °C, gas de cono: 50 (L/h) y gas de desolvatación: 800 L/h. Los resultados se resumen en el cuadro 3, Anexo 1.

### **3.7. Procedimiento de Validación**

El método LC-MS/MS fue validado de acuerdo con las directrices 2002/657/EC. Los criterios de identificación de LC-MS/MS se verificaron a

través del estudio de validación mediante el seguimiento de los tiempos de retención relativa, el reconocimiento de iones (relación señal-ruido (S/N)) y las intensidades relativas de iones (Cuadro 3).

Se determinaron los parámetros de validación del método, incluyendo linealidad, especificidad, recuperación, precisión (repetibilidad y reproducibilidad dentro del laboratorio) y límites analíticos (límite de cuantificación, nivel calibrado más bajo, límite de decisión  $CC\alpha$  y capacidad de detección  $CC\beta$ ). La especificidad del método se verificó a través del análisis de muestras negativas de leche obtenidas de diferentes fuentes. Las interferencias de otros analitos sobre la identificación y cuantificación se verificaron analizando muestras negativas fortificadas por separado con cada analito a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para probar la linealidad del método, se fortificaron muestras negativas a tres niveles de concentración (5, 50 y  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) para obtener una curva de calibración de cuatro puntos (incluyendo  $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) que cubrió el amplio rango de LMR para los analitos (Anexo 3). La recuperación y precisión se determinaron mediante el análisis de leche fortificadas en seis repeticiones a 0,5, 1, 1,5 y 2 veces el LMR (según se indica en el Cuadro 3, Anexo 1) ó  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  para los analitos sin límite especificado.

Para evaluar la precisión del método, se determinaron la repetibilidad y la reproducibilidad dentro del laboratorio. Los resultados de repetibilidad se obtuvieron en los cuatro niveles de validación bajo condiciones idénticas por el mismo operador en tres días separados (Anexo 1).

La selectividad se determinó mediante el análisis de muestras en blanco para demostrar la ausencia de interferencias cromatográficas. Esto fue además del análisis de las pruebas de confirmación LC-MS/MS, donde se determinaron dos

transiciones de MS/MS para cada analito según EC 2002/657. Las intensidades de iones relativas (de las muestras estándar y analíticas utilizadas para la validación, a concentraciones comparables) se midieron en las mismas condiciones.

Los valores de  $CC\alpha$  y  $CC\beta$  se determinaron utilizando muestras de leche en blanco enriquecidas con los analitos en torno al límite permitido (50  $\mu\text{g/g}$ , 100  $\mu\text{g/g}$  y 150  $\mu\text{g/g}$ ) y después de la identificación, las señales se representaron frente a la concentración agregada. La concentración correspondiente en el límite permitido más 1.64 veces la desviación estándar de la reproducibilidad dentro del laboratorio igualó el límite de decisión ( $\alpha = 5\%$ ), mientras que la concentración correspondiente en el valor del límite de decisión más 1.64 veces la desviación estándar de la reproducibilidad dentro del laboratorio es igual a la capacidad de detección ( $\beta = 5\%$ ) (Anexo 1).

**Cuadro 3:** Seguimiento de Reacciones Múltiples (MRM), con 2 transiciones.

Método LC-MS/MS

#	Analito	MS/MS	Cono de		Tiempo de permanencia (seg)	Función
		Transición	Voltaje (V)	Energía de colisión (eV)		
2	Albendazol	266.2 > 234.2(1)	40	15	0.20	I
		266.2 > 191.1(2)	40	30		
3	Albendazol sulfona	298.1 > 265.9(1)	40	28	0.20	I
		298.1 > 159.1(2)	40	15		
4	Albendazol sulfóxido	282.1 > 239.9(1)	40	28	0.20	I
		282.1 > 208.0(2)	40	15		
5	Triclabendazol	359.0 > 274.1(1)	50	25	0.20	II
		359.0 > 344.1(2)	50	28		
6	Triclabendazol sulfona	391.0 > 242.3	50	40	0.10	II
7	Triclabendazol sulfóxido	375.0 > 242.2	30	45	0.10	II

(1) Transición principal MRM utilizada para la cuantificación

(2) Transición secundaria MRM utilizada para la confirmación.

**3.8. Metodología experimental para la evaluación del efecto del TCBZ sobre los valores de recuentos de eritrocitos, hematocrito, leucocitos, subpoblaciones linfocitarias CD4 y CD8 y la expresión de citoquinas IL4 e IFN $\gamma$  en linfocitos T de sangre periférica de ovinos infectados con *F. hepatica***

**3.8.1. Unidad de análisis, universo y muestra**

Se empleó un número total de 14 ovinos, 8 animales del grupo infectado con *F. hepatica* tratado con TCBZ y ABZ y 6 animales para el grupo control sin tratamiento.

**3.8.2. Descripción del diseño de Investigación**

**Cuadro 4.** Del diseño experimental y procedimientos.

	Infección con metacercarias de <i>F. hepatica</i> N°	Tratamientos con TCBZ							
		Pre Tto	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Muestras Grupos		10	11	12	13	14	15	16	17
G. Control (n=6)	0		0	0	0	0	0	0	0
G. Tto (n=8)	150								
TCBZ (mg/kg)			12	12	12	24	24	48	48

**3.8.3. De los animales de experimentación**

Se emplearon un total de 14 carnerillos entre 6 meses – 1 año de edad, aparentemente sanos, con un peso entre 30-35 kg, los animales fueron identificados mediante aretado. Se estableció y acondicionó la crianza y mantenimiento de los dos grupos de animales en experimentación. Se habilitaron corrales adecuados, limpios y con disponibilidad *ad libitum* de alimento y agua. Se llevó el control médico permanente de los animales durante todo el periodo de experimentación.

Se dividieron en dos grupos:

Grupo Control Negativo (CN, n=6), se incluyeron 06 carnerillos aparentemente sanos, los cuales fueron mantenidos libres a la exposición a *F. hepatica* y tratamientos antihelmínticos con BZDs, en sistema intensivo en el distrito de Pacanguilla, provincia de Chepén, Departamento de la Libertad. Los animales fueron alimentados con heno de alfalfa, concentrado y agua *ad libitum*.

Grupo de ovinos en Tratamiento con TCBZ (GT, n=8), se incluyeron 8 carnerillos los cuales fueron mantenidos en sistema intensivo en los corrales de la Facultad de Ciencias Veterinarias, con un suministro de heno de alfalfa, concentrado y agua *ad libitum*. Los animales fueron infectados artificialmente con *F. hepatica*, a los cuales se les administró una dosis de infección de 150 metacercarias vía oral, el Período Prepatente de la infección (PPP) fue de 57 días post infección experimental. Una preparación comercial de TCBZ (Bilevón®) fue administrada durante un período de 60 días en dosis de 12, 24 mg y 48 mg/kg/día (Cuadro 4) respectivamente de acuerdo a la tolerancia al fármaco, cada una de las dosis fueron administradas y evaluadas según cuadro 4, durante toda la etapa de administración de la droga, hasta el final del experimento. Se realizaron 03 dosificaciones con ABZ a una dosis de 9 mg/kg p.v., una al inicio del experimento y durante los tratamientos T1 y T3 con TCBZ, según las fechas indicadas en el anexo 21.

#### **3.8.4. De la Infección de los animales en el Grupo en Tratamiento**

Inicialmente los animales del grupo en tratamiento fueron negativos a la presencia de huevos de *F. hepatica* en las heces, verificados mediante

examen parasitológico. Previo análisis y habiéndose encontrado otros parásitos, los animales fueron dosificados contra nematodos, coccidias y ectoparásitos (ABZ®, Baymec®, Baytril®). Los 8 ovinos del grupo en tratamiento fueron infectados con 150 metacercarias, vía oral. Las metacercarias fueron obtenidas en el laboratorio mediante protocolo de crianza e infección de caracoles y obtención de metacercarias (Anexos 23, 26). Las metacercarias fueron conservadas por pocas semanas a 4°C hasta que los animales fueron infectados. Las metacercarias adheridas en el plástico fueron contadas, recortadas y colocadas en cápsulas vacías de celulosa de 500 mg. La infección de los animales fue realizada introduciendo la cápsula en la parte posterior de la faringe, estimulando la deglución. Después de la confirmación del inicio del Período Pre Patente mediante examen parasitológico de heces, se inició el esquema de tratamiento con TCBZ, según lo especificado en el Cuadro 4.

### **Exámenes parasitológicos en heces**

#### **Conteo de huevos.**

Las muestras de heces fueron colectadas semanalmente del recto de los animales infectados en tratamiento y del grupo control. En cada muestreo de heces realizado, se evaluó la presencia de *F. hepatica* mediante el método de sedimentación modificado para la detección de huevos de trematodos de Urquhart et al., 2001, Anexos 23, 26. Los conteos de huevos de *F. hepatica* fueron expresados como el número de huevos por gramo de heces (hpg).

Para determinar la eficacia del tratamiento antihelmíntico con TCBZ, se empleó la metodología recomendada por la Asociación Mundial

para el Avance de la Parasitología Veterinaria (WAAVP). La prueba *in vivo* de reducción de la ovoposición en la materia fecal FECRT (Fecal Egg Count Reduction Test), que determina la eficacia antihelmíntica comparando la eliminación de huevos antes y después de un tratamiento, se calculó mediante la fórmula:  $FECR = \frac{\text{promedio hpg pre tratamiento} - \text{promedio hpg post tratamiento}}{\text{promedio hpg pre tratamiento}}$  (Coles, 1995, Young et al., 1999).

### **3.8.5. Evaluación de valores hematológicos**

Los animales fueron evaluados según esquema, mediante evaluaciones en sangre de los siguientes parámetros:

1. Recuento de eritrocitos, hematocrito, recuento total y diferencial de leucocitos (neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, monocitos y basófilos).
2. Determinación de subpoblaciones linfocitarias (CD4 y CD8) y expresión de citoquinas IL4, IFN $\gamma$  (Zafra, 2013).

#### **De las mediciones hematológicas de eritrocitos, hematocrito, recuento total y diferencial de leucocitos (neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, monocitos y basófilos)**

**Toma de muestras de sangre.** Las muestras fueron obtenidas cada 2 semanas desde el Muestreo 1 hasta el fin del experimento, el Muestreo 15. Se recolectó un volumen de 4-5 ml de sangre de la vena yugular externa en tubos de colección con EDTA de cada animal en experimentación y se mezcló adecuadamente. Estos se almacenaron a 4 ° C de acuerdo con Coles (1986) y se usaron dentro de las 12 h para los estudios hematológicos. Las muestras de sangre para

inmunohistoquímica, después de la separación y fijación de las células en láminas fueron congeladas a  $-70^{\circ}$  hasta su uso. El Recuento de células sanguíneas de rutina para los glóbulos rojos, linfocitos, granulocitos y monocitos se realizó utilizando un contador de células (Cámara de Neubauer) y el recuento diferencial en microscopio compuesto. La recolección de muestras de sangre se realizó el día posterior a la administración de los antiparasitarios.

Los índices hematológicos de las muestras de sangre recolectadas se analizaron utilizando métodos estándar. Los recuentos totales de eritrocitos y leucocitos (eritrocitos y leucocitos) se analizaron usando un hemocitómetro de Neubauer. El volumen de células empaquetadas (PCV) o hematocrito se determinó utilizando la técnica de centrifugación de microhematocrito (Dacie y Lewiz, 1984). El recuento diferencial de leucocitos se realizó según lo descrito por Coles (1986).

### **Determinaciones Inmunológicas. De las mediciones de subpoblaciones linfocitarias CD4 y CD8 y expresión de citoquinas IL4, IFN $\gamma$**

Se empleó la técnica de Inmunohistoquímica en frotis de leucocitos con anticuerpos monoclonales contra antígenos de membrana (Zafra et al., 2013), Anexo 23.

### **3.9. Análisis estadístico**

La evaluación del análisis de residuos fue realizada mediante el software de análisis Versión 1.4.1 para el espectrómetro de masas. Los datos obtenidos se analizaron con SPSS versión 16. Los datos de la investigación para efectos del

TCBZ fueron analizados a través de estadística descriptiva: media aritmética, desviaciones estándar, distribuidos en tablas de frecuencias. Para comparar los resultados entre grupos, se utilizó la prueba de Kolmogorov–Smirnov para confirmar normalidad y se utilizó la prueba T de Student para las comparaciones de los grupos en tratamiento y control. Se utilizó el programa IBM SPSS versión 23 para Windows (SPSS Inc., Chicago, USA). Un valor de  $p \leq 0.05$  fue considerado como significativo.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados se presentan en dos secciones. La primera sección describe los estudios realizados empleando la técnica de LC-MS/MS para el análisis de residuos en muestras de leche cruda bovina comercializada en Cajamarca. En la segunda sección, se presentan los resultados del efecto del TCBZ en ovinos *in vivo* sobre los recuentos de leucocitos, subpoblaciones linfocitarias CD4 y CD8 y la expresión de citoquinas IL4 e IFN $\gamma$  en linfocitos T de sangre periférica y parasitológicos de ovinos infectados con *F. hepatica*.

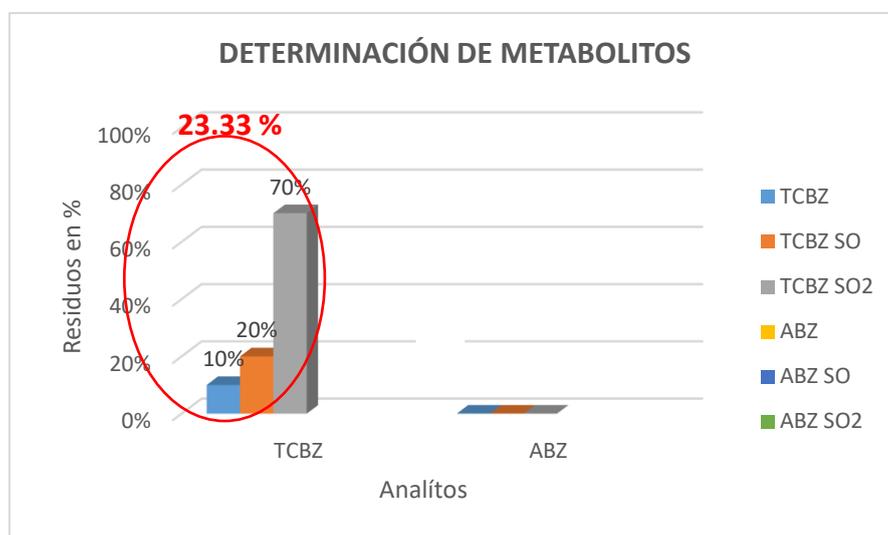
#### 4.1. Resultados de la determinación de metabolitos de TCBZ y ABZ.

**Tabla 1:** Residuos de los analitos (%) triclabendazol (TCBZ), triclabendazol sulfóxido (TCBZ SO), triclabendazol sulfona (TCBZ SO<sub>2</sub>), albendazol (ABZ), albendazol sulfóxido (ABZSO) y albendazol sulfona (ABZSO<sub>2</sub>) detectados en muestras de leche cruda bovina comercializada en el distrito de Cajamarca, mediante LC-MS/MS.

Matriz	Residuos de TCBZ y ABZ (Por Analitos)	n*	Analitos (%)	Positivos a Residuos (%)
Leche cruda con presencia de residuos (7)	TCBZ	1	10.0	23.33
	TCBZ SO	2	20.0	
	TCBZ SO <sub>2</sub>	7	70.0	
	ABZ	0	-	
	ABZ SO	0	-	
Leche cruda sin residuos (23)	ABZ SO <sub>2</sub>	0	-	76.66
<b>Total: 30</b>		<b>10</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

\*n: número de muestras con residuos de metabolitos de TCBZ y ABZ.

**Figura 3:** Residuos de los metabolitos (%) triclabendazol (TCBZ), triclabendazol sulfóxido (TCBZ SO), triclabendazol sulfona (TCBZ SO<sub>2</sub>), albendazol (ABZ), albendazol sulfóxido (ABZSO) y albendazol sulfona (ABZSO<sub>2</sub>) detectados en muestras de leche cruda bovina comercializada en el distrito de Cajamarca, mediante LC-MS/MS.



**Tabla 2:** Residuos de analitos de TCBZ (%) detectados en muestras de leche comercializada en el distrito de Cajamarca, mediante LC-MS/MS.

Matriz	Analito	n*	(%)
07	TCBZ	1	10
Leches crudas con presencia de residuos	TCBZ SO	2	20
	TCBZ SO <sub>2</sub>	7	70
<b>Total</b>		10	

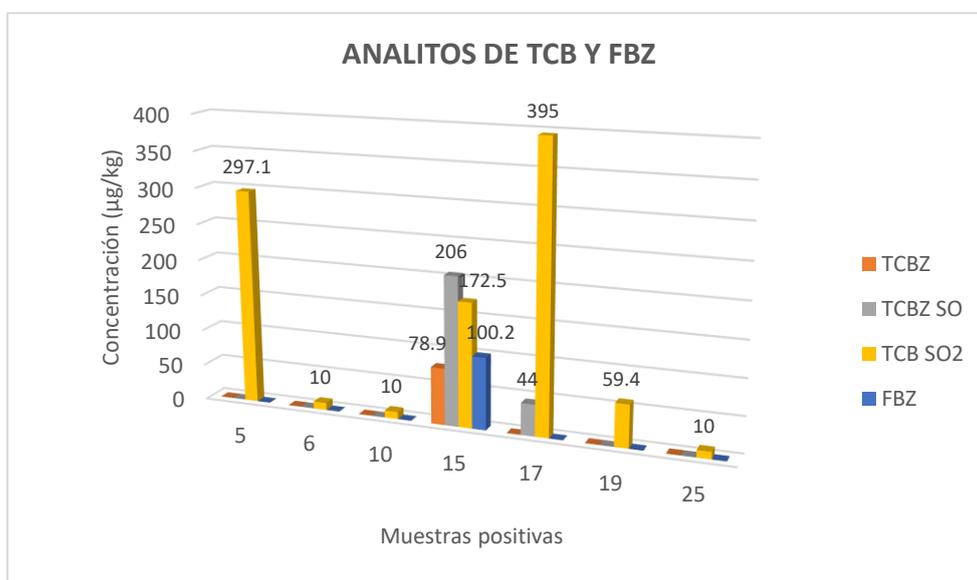
\*n: número de muestras con residuos de metabolitos de TCBZ

**Tabla 3:** Concentraciones de los analitos de TCBZ y ABZ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en las muestras de leche positivas.

N°	Matriz	TCBZ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	TCBZ SO Sulfóxido ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	TCBZ SO <sub>2</sub> (Sulfona) ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ABZ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ABZ SO ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ABZ SO <sub>2</sub> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
01	05	-	-	297.1	-	-	-
02	06	-	-	< LoQ*	-	-	-
03	10	-	-	< LoQ*	-	-	-
04	15	78.9	206	172.5	-	-	-
05	17	-	44	395	-	-	-
06	19	-	-	59.4	-	-	-
07	25	-	-	< LoQ*	-	-	-
Total		1	2	7			

\*(< LoQ) Concentraciones bajo el límite de cuantificación del método.

**Figura 4:** Resultados de la recuperación de todos los niveles de analitos de BZs (TCBZ, ABZ) ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en las matrices positivas estudiadas.



**Tabla 4:** Porcentaje de muestras de leche entre el Nivel Límite de detección (LLD) y muestras por encima de los LMRs para TCBZ y ABZ.

Antihelmínticos	Analitos	LMRs (µg/kg)	Número de muestras Bajo el Nivel Límite de Detección EUMRLs	Número de muestras con niveles sobre los EUMRLs
<b>TCBZ</b>	TCBZ	10		1 (3.33%)
	TCBZ SO	10		2 (6.66%)
	TCBZ SO <sub>2</sub>		3 (10.02%)	4 (13.33%)
<b>ABZ</b>	ABZ	100		-
	ABZ SO			-
	ABZ SO <sub>2</sub>			-
			20 (76.66%)	7 (23.33%)

. LLD: Limit level of detection. EUMRLs: Maximum residue limits of the European Union

En el presente trabajo se desarrolló un método de múltiples residuos (LC-MS/MS) para la determinación de los antihelmínticos TCBZ, ABZ y sus metabolitos; el cual fue utilizado para examinar la presencia potencial de antihelmínticos en leche de vaca del mercado cajamarquino. La metodología analítica de la prueba LC-MS/MS, en todos los procedimientos fueron validados apropiadamente, se desarrollaron los protocolos de Kinsella, 2009 y Lucas, 2016, Joint FAO/IAEA, 2016. Las curvas de calibración y los cromatogramas representativos se muestran en el Anexo 3 y Anexos 4 - 15. Los cromatogramas del análisis de las muestras de leche, en los blancos y estándares, mostraron la forma del pico del compuesto en estudio. Los resultados de la validación completa de la metodología analítica están resumidos en el Cuadro 3 y Anexo 1. Se optimizó la extracción química de las muestras, los analitos fueron extraídos con acetonitrilo en presencia de MgSO<sub>4</sub> y NaCl, para la inducción de la separación de fases, seguido por limpieza en la fase sólida dispersiva con una mezcla de sulfato de magnesio y C18. La selectividad fue demostrada, los analitos presentaron linealidades con valores de regresión lineal de R<sup>2</sup>>0,99

(Anexo 1). La recuperación de analitos estuvo en el rango de 80-110%, con repetibilidades y reproducibilidades típicas superiores en leche y <15% de Desviación Estándar Relativos. Estas recuperaciones altas se obtuvieron utilizando el método de extracción mencionado. El método mostró una alta precisión y exactitud, demostrado con un bajo CV ( $\leq 15\%$ ). El método resultó ser muy sensible y se obtuvieron LOQ  $< 5\mu\text{/kg}$  (Anexo 1). Después de ser validado el método, se empleó en la cuantificación de residuos de TCBZ y ABZ, los resultados se muestran en las tablas 1 a 4, figuras 3 y 4, anexo 16 con 23.33% de muestras positivas a metabolitos de TCBZ. Según lo encontrado en el presente trabajo de investigación, la presencia de residuos de TCBZ encontrados en leches crudas comercializadas en el distrito de Cajamarca, indican que no se cumplen las normas establecidas por las autoridades sanitarias del país NTP 202-001 (2003), NTS N° 071-MINSA/ DIGESA), donde se establece que la leche para consumo humano no debe presentar residuos de antiparasitarios en niveles superiores a los permisibles determinados por la autoridad sanitaria competente (NTS N° 071-MINSA/ DIGESA y Comisión del Codex Alimentarius (2010), el hallazgo de tales componentes encontrados en cualquier concentración, indica que una sustancia no permitida se viene empleando y que el alimento no cumple con los estándares de calidad establecidos.

Los antihelmínticos fasciolícidias están emergiendo como una clase importante de medicamentos veterinarios, una razón es la falta de alternativas sólidas en el control de la fasciolosis, esto lleva a una dependencia del control químico y consecuentemente a un uso significativamente mayor de estas drogas en la ganadería (Skuce y Zadoks, 2013). En el 2010, se restringieron varios fasciolícidias a nivel mundial para su uso en vacas lecheras destinadas a producir

leche para consumo humano (O'Brien et al., 2010). Si se administran fasciolicidas durante la lactancia, existe el riesgo de que sean transferidos a la leche como se ha demostrado en el presente trabajo de investigación (Tablas 1- 4 y Anexo 16, 17). La excreción de residuos de fasciolicidas en muestras de leche puede variar mucho entre drogas. Danaher et al. (2007) reportaron que la tasa de excreción de residuos de drogas en la leche puede depender de una serie de factores que incluyen las propiedades fisicoquímicas de la droga, la vía de administración (Michels et al., 1987), la condición corporal del animal y el estado de la microflora intestinal.

Se ha reportado que los residuos de TCBZ persisten en la leche durante al menos 10 a 17 días después del tratamiento (Power et al., 2013b). En Cajamarca, se investigó la persistencia de residuos de TCBZ en vacas en lactación utilizando el método LC-MS/MS, en donde se encontró que los residuos de TCBZ persistieron en la leche hasta 144 horas después del tratamiento (Imperiale et al., 2011). Se encontraron residuos de ABZ, ABZSO y netobimin a las 48 h post-tratamiento en vacas en lactación, aunque se encontraron debajo del LMR (Danaher et al., 2007). En el presente estudio no se encontró ABZ en ninguna muestra, probablemente debido a que su uso fue menos frecuente en Cajamarca en el período de la presente investigación, ya que según trabajos realizados por EMEA, 2004 en vacunos, los residuos totales de ABZ en leche fueron cerca de 5000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a las 11 horas después de la administración de una dosis de 15 mg pv., reduciendo a 640  $\mu\text{g}/\text{kg}$  después de 35 horas y 35  $\mu\text{g}/\text{kg}$  después de 72 horas, considerando estos períodos de eliminación podría esperarse la presencia de residuos de ABZ en Cajamarca y otros lugares como se han reportado en otras investigaciones (Fletouris et al., 1998; Jedziniak et al., 2015).

Power et al. (2013) investigó la persistencia de los residuos de TCBZ en leche y encontró una concentración de TCBZ SO<sub>2</sub> de 2400 µg /kg a diferencia de los encontrados en el presente trabajo de 395 µg/kg. Después de la administración los niveles más altos de TCBZ, TCBZ SO y TCBZ SO<sub>2</sub> medidos en las muestras individuales de leche fueron de 244, 525, 1710/ kg, respectivamente. Los residuos de TCBZ, TCBZ SO y TCBZ SO<sub>2</sub> fueron detectables en la leche hasta 5, 15, 20 días después del tratamiento, respectivamente. Los residuos de TCBZ fueron menores que el LMR de 10 µg/kg a los 17 días después del tratamiento. En el presente trabajo de investigación se encontraron residuos de TCBZ SO en niveles superiores a los permitidos, Tablas 3 y 4. El TCBZ SO tiene una alta capacidad embriotóxica *in vitro* durante la etapa de pre implantación fetal (Boix, 2015). Los resultados difieren con los encontrados en un muestreo realizado en la ciudad de Cajamarca en donde se realizaron determinaciones de TCBZ y TCBZ SO en 29 muestras de queso y 25 muestras de leche, ninguna presentó residuos, por lo que se consideraron libres del antiparasitario, dichas muestras fueron evaluadas por HPLC (Reyna y Palacios, 2014).

La extracción y purificación de residuos de BZDs de la leche plantea un desafío difícil. En la actualidad, la mayoría de los métodos utilizados para la detección de residuos generalmente no incluyen un rango completo de marcadores para múltiples residuos. En los últimos años, la cromatografía líquida junto con la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) ha encontrado una aplicación más generalizada en el análisis de residuos de BZDs en los alimentos, incluida la leche, ya que ofrece una detección más sensible, mayor exactitud en la determinación del compuesto, se puede monitorear un elevado número de antihelmínticos, tiene la capacidad para detectar concentraciones de pesticidas

mucho más bajas y una mayor confianza en los resultados obtenidos (De Ruyck et al., 2002; Jedziniak et al., 2009; Niell et al., 2013), sin embargo, con la desventaja de que los instrumentos de masas siguen siendo bastante caros y no están disponibles en la mayoría de los laboratorios (Denžić et al., 2017). Chen et al. (2010) usó el método HPLC-DAD para la determinación de 11 BZDs y metabolitos en 50 muestras de leche obtenidas de productores lecheros locales en China. No se encontraron residuos detectables de analitos en ninguna de las muestras. Jedziniak et al. (2015) encontró un bajo porcentaje de residuos (0.83% para ABZSO<sub>2</sub>) de ABZ, FBZ, TCBZ y 27 otros antihelmínticos en leche y productos lácteos de cabras y ovejas de supermercados en Polonia. Estos resultados correlacionan con los resultados oficiales del control de residuos en Europa (European Food Safety Authority, 2012). Sin embargo, algunas excepciones importantes a las publicaciones antes mencionadas han sido reportadas en Brasil, en diferentes localidades del estado de Minas Gerais – Brasil, encontrando TCBZ en el 38 (45.78%) de muestras (Cerqueira et al., 2014). Tsiboukis et al. (2013), examinaron 123 muestras de leche del mercado griego de ABZ y FBZ utilizando el método HPLCDAD. Encontraron un alto porcentaje (27.6%) de muestras positivas, y en 14 muestras (11.4%) los residuos excedieron los LMR, similares a lo encontrado en el presente trabajo. Los resultados encontrados confirman que, en Cajamarca, los residuos de antihelmínticos en productos lácteos pueden ser un tema importante en el área de seguridad alimentaria local, ya que, los factores estacionales, geográficos y productivos particulares de la zona, favorecen la alta prevalencia de fasciola y otros parásitos, siendo necesario el uso continuo de antihelmínticos. La presencia de residuos en el presente trabajo de investigación, confirma la necesidad de tratar a los animales

durante el período en seca. Igualmente es necesario realizar estudios similares al respecto, brindando acceso de los agricultores al asesoramiento profesional, junto con programas de monitoreo permanentes para asegurar la salud de los consumidores, controlar y garantizar la calidad de la leche que se produce en la región, ya que la ingestión de residuos de medicamentos veterinarios constituye un peligro potencial para la salud de los consumidores., incluida, específicamente, la posibilidad de desarrollar resistencia a múltiples fármacos, embriotoxicidad, reacciones de hipersensibilidad y desbalance de la microflora intestinal normal, entre otros (Rana et al., 2019).

**4.2. Resultados de la evaluación del efecto del TCBZ sobre los valores hematológicos e inmunológicos: Eritrocitos, hematocrito, recuento diferencial de leucocitos, linfocitos CD4 y CD8 y la expresión de citoquinas IL4 e IFN $\gamma$  en linfocitos T de sangre periférica de ovinos infectados con *F. hepatica*.**

**Tabla 5:** Efecto del tratamiento antihelmíntico con TCBZ sobre los valores promedios de los parámetros hematológicos ( $\pm$ DS), de ovinos en tratamiento infectados con *F. hepatica* y de ovinos del grupo control no infectados.

Parámetros Hematológicos	Ovinos infectados y con tratamiento TCBZ, promedio ( $\pm$ DS),	Ovinos no infectados, control, promedio ( $\pm$ DS),	Valor “t”	Nivel de significancia
Hto (%)	31.0 $\pm$ 3.4 (29.03-32.97)	39.6 $\pm$ 0.75 (39.2-40.1)	8.416	.000
Eritrocitos (x10 <sup>6</sup> /ul)	8.75 $\pm$ 9.4 (8.2-9.2)	10.7 $\pm$ 6.3 (10.3-11.02)	5.220	.000
Leucocitos (x10 <sup>3</sup> /ul)	6.9 $\pm$ 1.03 (6.3-7.5)	8.3 $\pm$ 7.5 (7.9-8.7)	4.468	.001
Neutrófilos (%)	16.5 $\pm$ 7.4 (12.19-20.8)	15 $\pm$ 4.8 (12.17-17.82)	-.618	.547
Linfocitos (%)	74.04 $\pm$ 10.3 (68.09-79.99)	78.98 $\pm$ 6.1 (75.43-82.54)	1.478	.163
Eosinófilos (%)	4.4 $\pm$ 2.3 (3.09-5.80)	2.2 $\pm$ 1.5 (1.3-3.09)	-3.112	.008
Monocitos (%)	2.43 $\pm$ 1.15 (1.76-3.10)	2.39 $\pm$ 1.2 (1.69-3.08)	-0.086	.933
Basófilos (%)	0.018 $\pm$ 0.047 (0.0087-0.045)	0	-1.472	.165

P<0.05, altamente significativo. Valores entre paréntesis refiere a los rangos observados en los valores.

**Tabla 6:** Efecto del tratamiento antihelmíntico con TCBZ en los valores promedios de subpoblaciones linfocitarias (CD4 y CD8) y citoquinas IL4 e INF $\gamma$  ( $\pm$ DS), de ovinos infectados con *F. hepatica* y de ovinos controles no infectados.

Variable Inmunológica	Grupo tratamiento	Grupo control	Valor “t”	Nivel de significancia
CD4	45.97 $\pm$ 9.1 (31.42-60.51)	33.95 $\pm$ 18.8 (4.0-63.89)	-0.514	.618
CD8	34.31 $\pm$ 6.42 (24.09-44.53)	32.5 $\pm$ 19.2 (1.87-63.12)	1.193	.258
IL4	37.06 $\pm$ 6.37 (26.91-47.21)	14.66 $\pm$ 5.89 (5.28-24.04)	-4.251	.008
INF $\gamma$	13.09 $\pm$ 1.36 (10.93-15.26)	57.04 $\pm$ 1.13 (55.23-58.84)	6.646	.001

P<0.05, altamente significativo. Valores entre paréntesis refiere a los rangos observados en los valores.

#### 4.3. Resultados de la evaluación del efecto del TCBZ sobre los valores parasitológicos de ovinos controles y de ovinos infectados con *F. hepatica*.

**Tabla 7:** Efecto del tratamiento antihelmíntico con TCBZ en los Recuentos promedio de huevos de *F. hepatica* (hpg) y el % de Eficacia (FECRT) en ovinos infectados con *F. hepatica* y en ovinos controles no infectados.

Grupos	Nº Animales	T0 Pre Tratamiento ( $\pm$ DS),	T1 Post Tratamiento Inicial ( $\pm$ DS),	T1-T7 Post tratamiento TCBZ (n=7 tratamientos) ( $\pm$ DS),
Control no infectado (hpg)	06	0	0	0
Infectado con <i>F. hepatica</i> y tratamientos con TCBZ (hpg)	08	122.88 $\pm$ 77.31	57.63 $\pm$ 50.81	72.95 $\pm$ 17.56
% Eficacia (FECRT)			<b>53.1</b>	<b>40.64</b>

**Tabla 8:** Eficacia (%) del TCBZ contra *F. hepatica* en ovinos después de 7 tratamientos consecutivos con TCBZ, en dosis de 12 mg/ kg (3 dosis), 24 mg/ kg (2 dosis), 48 mg/ kg (2 dosis) vía oral, según FECRT.

Grupo en Tratamiento	Control Pre Tratamiento (hpg)	T1 TCB Z 12 mg vía oral (hpg)	T2 TCB Z 12 mg vía oral (hpg)	T3 TCB Z 12 mg vía oral (hpg)	T4 TCB Z 24 mg vía oral (hpg)	T5 TCB Z 24 mg vía oral (hpg)	T6 TCB Z 48 mg vía oral (hpg)	T7 TCB Z 48 mg vía oral (hpg)	T1-T7 (hpg)
Muestras	10	11	12	13	14	15	16	17	
N° Animales	10	11	12	13	14	15	16	17	
1	10	1	3	10	15	5	43	0	
2	256	120	162	121	107	97	100	112	
3	69	0	9	3	7	0	0	0	
4	141	32	113	103	117	125	126	124	
5	130	45	117	200	191	95	12	2	
6	90	65	86	80	67	77	42	69	
7	88	58	77	81	89	3	4	0	
8	199	140	154	134	129	174	110	129	
Σ	983	461	721	732	722	576	437	436	583.57
Promedio	122.88	57.63	90.13	91.5	90.25	72	54.63	54.5	72.94
% Eficacia		53.10	26.65	25.53	26.55	41.40	55.54	55.64	40.64

Para los resultados de la evaluación del efecto del TCBZ sobre los valores parasitológicos, hematológicos e inmunológicos, la Tabla 5, muestra un resumen de los promedios de la determinación de los índices hematológicos para el grupo de ovinos infectados tratados con TCBZ y el grupo control no infectado. Los resultados obtenidos muestran que los niveles de eritrocitos, hematocrito y leucocitos fueron menores en los ovinos del grupo en tratamiento que en el grupo control, el análisis estadístico reveló diferencias altamente significativas entre grupos ( $p < 0.05$ ). Esto sugiere que los ovinos son particularmente susceptibles a la pérdida de sangre asociado a las infecciones con *Fasciola* (Soun et al., 2006) y que este efecto no disminuyó significativamente cuando se aplicaron los tratamientos antihelmínticos, aunque se observó una mejora en los valores a partir del muestreo 10. La reducción en los recuentos de eritrocitos y hematocrito en la presente investigación puede deberse a la pérdida aguda de sangre durante la migración por el parénquima hepático o por la presencia de las fasciolas en los conductos biliares, estos

valores fueron disminuyendo a medida que avanzaba la infección, como lo encontrado por Robles-Pérez et al. (2014). El signo clínico más frecuente observado en todos los animales infectados en tratamiento fue la anemia, con un score promedio de 4 a FAMACHA, método de evaluación clínica según Burke et al. (2007). La anemia puede ocurrir debido a la inflamación crónica del hígado, la cual causa supresión en la eritropoyesis (Gattani et al., 2015; Lotfy et al., 2003). Se observó un animal con edema submandibular. El hematocrito, junto con la determinación clínica de anemia puede ser una herramienta útil en la evaluación rápida y en el grado de severidad de la infección por fasciola (Hawkins, 1984). El valor promedio de hematocrito fue de 31%, con los valores más bajos de 27.8 y 27% durante las semanas 18 a 21 post infección. Los efectos adversos dependen de la carga parasitaria administrada en animales de experimentación (Mehlhom y Armstrong, 2001; Coop y Kryziakis, 2001; Wiedosari et al., 2006), Los valores encontrados son superiores a lo encontrado por otros autores, quienes reportaron hematocritos de 10, 13 y 15% en ovinos experimentalmente infectados, reportando muerte de los animales, esto debido probablemente al número de metacercarias administradas que fueron entre 50-5000 (Hawkins, 1984), mientras que en el presente trabajo se administraron 150 metacercarias, observándose cambios hematológicos significativos en el grupo de animales infectados. Se encontró diferencias significativas en cuanto al número de leucocitos entre ambos grupos de experimentación, mostrando una disminución significativa en el grupo en tratamiento especialmente a partir del muestreo 10, resultados diferentes a los reportado en trabajos previos por Ahmed et al. (2006), Zhang et al. (2005) y Sykes et al. (1980), quienes evaluaron solamente los efectos de la parasitosis. Se encontraron diferencias significativas en el número de leucocitos con los controles en las semanas 10, 17, 18 a semana, hasta la 39 semana post infección y tratamiento con TCBZ, manteniéndose los recuentos constantemente bajos. Los resultados de los recuentos diferenciales muestran

que hubo un aumento de neutrófilos y eosinófilos del ganado infectado, aun cuando las diferencias en ambos grupos no fueron significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores de los neutrófilos encontrados fluctuaron a lo largo de todo el período de experimentación en los ovinos infectados en comparación con el control, probablemente debido a infecciones leves como conjuntivitis y otitis externa ocurridas durante el periodo de investigación. No se observaron diferencias en los valores de monocitos y basófilos en ambos grupos.

Los valores promedios de eosinófilos en la sangre según intervalos de tiempo se muestran en el Anexo 17. Los valores expresados en porcentajes más altos encontrados fueron de  $8.8 \pm 5.5$  y  $7.3 \pm 6.3$ , durante las semanas 18 y 21 post infección. En general los valores promedios se encuentran entre los rangos normales. En los animales infectados los valores fueron más altos, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa comparado con los controles, probablemente debido a que el período de tratamiento con las fasciolicidas fue permanente a partir del muestreo 21. El grupo infectado mostró una elevación significativa de eosinófilos desde la tercera, semana post infección hasta la semana 18 y 21 post infección. A partir de la semana 21 post infección y tratamiento con TCBZ los recuentos no excedieron los rangos normales, mientras que el grupo control mostró un valor consistentemente bajo, este porcentaje permaneció bajo hasta la semana 26, muestreo 13 hasta el final del experimento, en donde se observó un ligero incremento probablemente debido a la presencia de zancudos durante los meses de diciembre a marzo. Los parámetros hematológicos en el grupo control no infectado estuvieron dentro de los rangos de referencia, excepto en los neutrófilos durante los meses de junio, julio y agosto, es donde se observó un ligero incremento debido probablemente a una leve infección por el aretado y conjuntivitis por mosquitos. Los resultados encontrados coinciden con estudios previos acerca del efecto de la infección experimental con *F. hepática* (Ahmed et al., 2006; Martínez-Moreno et al., 1997; Robles-Pérez et al., 2014a). Se observó una leve

a moderada linfocitosis inicial hasta el muestreo 10 y linfopenia, estadísticamente no significativa al final del experimento.

La cinética de la respuesta celular de linfocitos CD4 fue estadísticamente no significativa entre ambos grupos (Tabla 6, Anexo 20), aun cuando se aprecia un aumento celular en el grupo en tratamiento a partir de la 10 semana post infección hasta el final del experimento. Las diferencias en los linfocitos CD8 no fueron estadísticamente significativas entre grupos, observándose disminución en el grupo en tratamiento a partir de la 13ava semana, muestreo 5 post infección, elevándose durante la fase crónica de la infección y disminuyendo nuevamente a partir del muestreo 10 hasta el final del experimento. Los resultados de la tabla 6, Anexo 20 muestran una expresión estadísticamente significativa de citoquina IL4 entre grupos. En el grupo en tratamiento la expresión de citoquina IL4 producida aumentó en el tiempo desde el inicio de la infección, con un incremento en la respuesta en la semana 10 y que se mantuvo hasta el fin del experimento a medida que la infección progresaba, igualmente durante el tratamiento con antihelmínticos. La expresión de IFN- $\gamma$  fue significativamente menor en el grupo en tratamiento ( $p < 0.05$ ). Los niveles de expresión de IFN- $\gamma$  fueron inferiores a los esperados de una respuesta positiva. El análisis estadístico reveló diferencias no significativas entre células CD4 y CD8 de ambos grupos, mientras que en la expresión de IL4 y de IFN- $\gamma$ , hubo diferencias significativas en ambos grupos a lo largo de todo el periodo experimental. Se observó un incremento notorio en la expresión de IL4 a partir de la semana 21 post infección, asimismo una disminución significativa en la expresión de IFN- $\gamma$  a partir de la semana 10 post infección, que se mantuvo hasta el final del experimento en relación al grupo control (Anexo 20). Las respuestas inmunes a la mayoría de los helmintos provocan respuestas similares, que se caracterizan por la producción de citoquinas asociadas de tipo 2 (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) y anticuerpos (IgG1 en ratones, IgG4 en humanos e IgE

en ambas especies). Una vez iniciadas, las respuestas inmunes tipo 1 y tipo 2 tienden a contrarrestar entre sí a través de la acción de las citoquinas que son específicas para cada tipo de respuesta, siendo en este caso el análisis de las citoquinas IL-4 e INF $\gamma$  de una respuesta inmune predominante tipo 2 en ovinos infectados con metacercarias de *F. hepatica*, mientras que no se observaron cambios significativos a partir de la aplicación del TCBZ a las dosis evaluadas. En general los efectos del TCBZ sobre los valores hematológicos e inmunológicos no se observaron cambios adversos significativos, excepto por una leucocitosis transitoria seguida de linfocitosis y una mayor expresión de linfocitos CD4 con disminución de linfocitos CD8, recomendándose la evaluación de la droga en dosis superiores a las empleadas en el presente trabajo.

Las Tablas 7 y 8, muestran el efecto del tratamiento antihelmíntico con TCBZ en los recuentos promedio de huevos de *F. hepatica* (hpg) y el % de Eficacia (FECRT) en ovinos infectados y en ovinos controles no infectados. Se colectaron muestras de heces para el análisis parasitológico a partir de la semana 0 y hasta el tratamiento 7 con TCBZ. Después del T7, un ovino mostró signos moderados de decaimiento e inapetencia durante un día. Ninguno de animales restantes desarrolló reacciones severas adversas a la administración continua del antihelmíntico en estudio. Las cuentas de huevos pre-tratamiento variaron entre 10 y 256 con un promedio de 122.88 hpg. Los primeros huevos de fasciola aparecieron en las heces de los ovinos a partir de la 8va semana (PPP: 57 días) posterior a la infección con metacercarias del parásito. Los conteos de huevos se incrementaron progresivamente sobre la 8va semana con un conteo promedio desde 17.75 hpg hasta 122.87 hgh en la semana 24 previa al inicio del tratamiento con antihelmínticos (Anexo 21). En las siguientes semanas desde el inicio del tratamiento con TCBZ, los conteos disminuyeron. El análisis de la producción de huevos de *F. hepatica* por gramo de heces mostró una reducción inicial del 53.10% para el grupo en tratamiento post

dosificación y una reducción del 40.64% después de los 7 tratamientos consecutivos con TCBZ.

La Tabla 8 muestra el conteo de huevos en heces después del tratamiento con TCBZ a dosis de 12 (n=3), 24 (n=2), 50 (n=2) mg/ kg, vía oral. Se colectaron muestras de heces para el análisis parasitológico a partir de la semana 0 y hasta el tratamiento 7. El primer control inicial después de la primera dosificación mostró una eficacia de 53.10%. La eficacia de los tratamientos 2 al tratamiento 4 mostraron los niveles más bajos de eficacias, 26.65%, 25.53% y 26.55% con dosis de 12 y 24 mg/kg en el tratamiento 5. En el segundo tratamiento con 24 mg/kg p.v., y en los tratamientos 6 y 7 post dosificación con 45 mg/kg p.v., los porcentajes de eficacia se incrementaron a 41.40%, 55.54% y 55.64 % respectivamente. Concluyéndose que a pesar del incremento en la dosis de desafío con el antihelmíntico suministrado en intervalos de tiempo muy cortos, no mejoró el % de eficacia del TCBZ.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES

1. Se determinó la presencia de residuos de TCBZ, TCBZ SO y TCBZ SO<sub>2</sub> en el 23.33% de las muestras de leche cruda bovina comercializada en el distrito de Cajamarca, mediante la técnica de LC-MS/MS. Las concentraciones de residuos en las muestras positivas excedieron en el 26.65% el LMR. Los resultados obtenidos fueron comparados con los estándares establecidos por el Codex Alimentarius y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA).
2. El metabolito TCBZ SO<sub>2</sub> se encontró en el 70% de las muestras positivas, el TCBZ SO en el 20% de las muestras positivas y el TCBZ en el 10% de las muestras positivas. No se encontraron residuos de metabolitos de ABZ. Las concentraciones máximas de metabolitos de TCBZ encontrados fueron de 395 µg/kg y la concentración mínima fue de 44 µg/kg de TCB SO<sub>2</sub>.
3. Los efectos del TCBZ en ovinos infectados experimentalmente con *F. hepatica* sobre los valores hematológicos, mostraron una disminución significativa de eritrocitos, hematocrito y leucocitos ( $p < 0.05$ ), en el grupo infectado. Se observó una leve a moderada linfocitosis, neutrofilia y eosinofilia. Los valores hematológicos en el grupo control estuvieron dentro de los rangos de referencia, excepto por una leve neutrofilia y eosinofilia transitoria al inicio y al final del experimento respectivamente. Se observó leucocitosis al inicio del tratamiento, para luego mostrar leucopenia y linfopenia en el grupo infectado al final del experimento.

4. El efecto del tratamiento antihelmíntico con TCBZ, sobre los valores promedios de subpoblaciones linfocitarias (CD4 y CD8) y citoquinas IL4 e INF $\gamma$  de ovinos infectados con *F. hepatica* mostró una mayor expresión de linfocitos CD4 con disminución de linfocitos CD8 (( $p < 0.05$ )). El análisis de las citoquinas IL-4 e INF $\gamma$  describieron una respuesta inmune predominante tipo Th 2 en ovinos infectados con metacercarias de *F. hepatica*, mientras que no se observaron cambios significativos a partir de la aplicación del TCBZ. En general los efectos del TCBZ sobre los valores hematológicos e inmunológicos no mostraron cambios adversos significativos a las dosis de 12, 24 y 48 mg/kg pv., excepto por una leucopenia, linfopenia transitoria y una mayor expresión de linfocitos CD4 con disminución de linfocitos CD8 a las dosis evaluadas de TCBZ.
  
5. La eficacia del TCBZ sobre *F. hepatica*, mediante la prueba de reducción del número de huevos en heces (FECRT), mostró una reducción para el grupo en tratamiento del 40.64% después de los 7 tratamientos consecutivos con TCBZ. La eficacia del TCBZ a las dosis de 12, 24 y 48 mg/kg. de p.v. administrados por vía oral (n=7), en ovinos artificialmente infectados con *F. hepatica*, fue de 53.10%, 26.65%, 25.53%, 26.55%, 41.40%, 55.54% y 55.64 % respectivamente. Concluyéndose que a pesar del incremento en las dosis de desafío con el antihelmíntico suministrado en intervalos de tiempo muy corto, no mejoró el % de eficacia del TCBZ.

## **CAPÍTULO VI**

### **RECOMENDACIONES**

1. Realizar estudios epidemiológicos sobre la presencia de otros antihelmínticos en la leche cruda y otros productos de origen animal, a fin de no exceder la ingesta diaria aceptable permitida según la normativa vigente.
2. Recomendar el uso responsable de los antihelmínticos en animales domésticos. El tratamiento de la fasciolosis debe complementarse con medidas que tengan como objetivo reducir las tasas de infección, incluyendo: información, educación, investigación de nuevas alternativas de control, promoviendo medidas ambientales tales como el control de hospederos y el drenaje de las tierras de pastoreo.
3. Se deben establecer e implementar en nuestro país, programas de monitoreo de control de residuos de antihelmínticos en los alimentos, que aseguren la protección del consumidor, basadas en datos científicos y establecer marcos estrictos de cumplimiento de las mismas.

## LISTA DE REFERENCIAS

- Aguilera-Luiz, M.M., Vidal, J.L.M., Romero-González, R., Frenich, A.G. 2008. Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 1205, 10–16.
- Ahmed, I.M., Ambali, A.G., Baba, S.S. 2006. Haematological and biochemical responses of Balami sheep to experimental *Fasciola gigantica* infection. *J. Food Agric. Env.* 4(2), 71–74.
- Allen, J.E., Maizels, R.M. 1996. Review. Immunology of human helminth infection. *Int Arch Allergy Immunol*. Jan. 109(1), 3–10.
- Alvarez, L., Suárez, G., Ceballos, L., Moreno, L., Lanusse, C. 2012. Dose-dependent systemic exposure of albendazole metabolites in lambs. *J Vet Pharmacol Ther.* 35, 365–372.
- Alvinerie, M., Galtier, P. 1986. Assay of triclabendazole and its main metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 374, 409–414.
- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., Schenk, F.J. 2003. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC International*. 86, (2). 412.
- Beesley, N.J., Caminade, C., Charlier, J., Flynn, R.J., Hodgkinson, J.E., Martínez-Moreno, A., Martínez-Valladares, M., Pérez J., Rinaldi L., Williams, D.J.L. 2018. *Fasciola* and fasciolosis in ruminants in Europe: Identifying research needs. *Transbound Emerg Dis.* 65(1), 199–216. [wileyonlinelibrary.com/journal/tbed](http://wileyonlinelibrary.com/journal/tbed).
- Behm, C. A., Sangster, N. C. 1999. Chapter 6, Pathology, Pathophysiology and Clinical Aspects. In Dalton, J. P. *Fasciolosis*. CABI international, Wallingford, 185–224
- Bennett, E.M., Bryant, C. 1984. Energy metabolism of adult *Haemonchus contortus* in vitro: a comparison of benzimidazole-susceptible and resistant strains. *Mol Biochem Parasitol.* 10(3), 335–46.
- Betancourt, A., Lyons, E.T., Horohov, D.W. 2014. Characterization of the inflammatory cytokine response to anthelmintic treatment in ponies. *EquineVet Journal.* 47(2),240–244.

- Beyene T. 2016. Veterinary drug residues in food-animal products: its risk factors and potential effects on public health. *J Vet Sci Technol* 7:1-7.
- Bick, P., 1982. Immune System as a Target Organ for Toxicity. *Environmental Health Perspectives*. 43, 3–7.
- Boix, N, Teixido, N., Vila-Cejudo, M., Ortiz, P., Ibáñez, E., Gómez Catalán, J., Llobet, J., Barenys, M. 2015. Risk assessment for human embryonic development of Triclabendazole residues in milk and cheese in the diet of a rural population in Cajamarca (Peru): A preliminary approach. *PLoS ONE* 10(3): e0121308. doi: 10.1371/journal.pone.0121308.
- Boray, J.C., Crowfoot, P.D, Strong, M.B., Allison, J.R., Schellenbaum, M., Von Orelli, M., Sarasin, G. 1983. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. *Vet. Rec.* 113,315–317.
- Brandon, D.L., Bates, A.H., Binder, R.G., Montague, W.C., J.R., Whitehand, L.C., Barker, S.A. 2002. Analysis of fenbendazole residues in bovine milk by ELISA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 5791–5796.
- Brennan, G. P., Fairweather, I., Trudgett, A., Hoey, E., McCoy, M. McConville, Meaney, M. Robinson, M., McFerran, N., Ryan, L., Lanusse, C., Mottier, L. Alvarez, L., Solana, H., Virkel, G., Brophy, P.M. 2007. Understanding triclabendazole resistance. *Exp. Mol. Pathol.* 82, 104–109, doi: 10.1016/j.yexmp.2007.01.009.
- Burchiel, S.W., Lauer, F.T., Gurulé, D., Mounho, B.J., Salas, V.M. 1999. Uses and Future Applications of Flow Cytometry in Immunotoxicity Testing Methods. 19: 28–35.
- Burke, J.M., Kaplan, R.M., Miller, J.E., Terrill, T.H, Getz, W.R., Mobini, S., Valencia, E., Williams, M.J., Williamson, L.H., Vatta, A.F. 2007. Accuracy of the FAMACHA system for on-farm use by sheep and goat producers in the southeastern United States. *Veterinary Parasitology*. 147(2), 89–95.
- Carr, A.W., McCracken, R.O., Stillwell, W.H. 1993. Uncoupling of rat liver mitochondrial oxidative phosphorylation by the fasciolicide triclabendazole and its sulfoxide and sulfone metabolites. *Journal of Parasitology*. 79, 198–204.
- Carrara Moreti, D.L., Lopes, R.A., Vinha, D., Sala, M., Sempini, A Friedrichi, M., 2005. Efectos del Albendazol en el hígado de feto de rata. *Estudios Morfológicos y morfométricos*. *Int. J. Morph.* 23(2), 111–120.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2013. Fasciola infection, Life cycle *F. hepatica*. <https://www.cdc.gov/parasites/fasciola/biology.html>.

- Cerqueira, M., Souza, F., Cunha, A., Almeida, L. 2014. Detection of antimicrobial and anthelmintic residues in bulk tank milk from four different mesoregions of Minas Gerais State-Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 66(2), 621–625.
- Cervi, L., Masih, D.T. 1997. Inhibition of spleen cell proliferative response to mitogens by excretory-secretory antigens of *Fasciola hepatica*. *Int J Parasitol.* 27, 573–579. doi: 10.1016/S0020-7519(96)-00188-9.
- Chauvin, A., Bouvet, G., Boulard, C. 1995. Humoral and cellular immune responses to *Fasciola hepatica* experimental primary and secondary infection in sheep. *Int J Parasitol.* 25 (10), 1227–41.
- Chen, D., Tao, Y., Liu, Z., Liu, Z., Huang, L., Wang, Y., Yuan, Z. 2010. Development of a high-performance liquid chromatography method to monitor the residues of benzimidazoles in bovine milk. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 878, 2928–2932.
- Chuquiruna, M. 2011. Frecuencia de Fasciolosis y Cisticercosis en Animales Beneficiados en el Camal Municipal de Baños del Inca. Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Cajamarca. Pág. 25.
- Claridge, J., Diggle, P., McCann, C.M., Mulcahy, G., Flynn, R., McNair, J., Williams, D. J. L. 2012. *Fasciola hepatica* is associated with the failure to detect bovine tuberculosis in dairy cattle. *Nature Communications.* 3, 853.
- Claxton, J.R., Zambrano, H., Ortiz, P., Delgado, E., Escurra, E., Clarkson, M. 1998. Strategic control of fasciolosis in the inter-Andean valley of Cajamarca, Perú. *Vet. Rec.* 143, 42–45.
- Codex Alimentarius Commission. 2010. International Food Standards. Métodos de Análisis y Toma de Muestras. ALINORM 08/31/31 Apéndice VI. [www.codexalimentarius.org/codex-home/es/](http://www.codexalimentarius.org/codex-home/es/).
- Codex Alimentarius Commission. 2012. Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in foods. CAC/MRL 2–2012.
- Coles, E.H. 1986. *Veterinary Clinical Pathology*. 4th Ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, London and Toronto.
- Coles, G.C. 1986. Anthelmintic activity of triclabendazole. *Journal of Helminthology*, 60, 210–212.

- Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H.M., Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M.A., Waller, P.J., 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP). methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 44, 35–44.
- Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., Von Samsonhimmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M.A., Vercruyssen, J. 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol.* 136, 167–185
- Coop, R.L., Kyriazakis, I. 2001. Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. *Trends Parasitol.* 17, 325–330.
- Cordero del Campillo, M., Rojo Vásquez, F. 1999. *Parasitología Veterinaria*. McGraw-Hill-Interamericana. 968 p.
- Cray, C., Villar, D., Zaias, J., Altman, N. 2008. Effects of Fenbendazole on Routine Immune Response Parameters of BALB/c Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 47(6), 32–36.
- Cristófol, C., Navarro, M., Franquelo, C., Carretero, A., Ruberte, J., Arboix, M. 1997. Disposition of netobimin, albendazole and its metabolites in the pregnant rat: Developmental Toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 144, 56–61.
- Cwiklinski, K., O'Neill, S. M., Donnelly, S., Dalton, J. P. 2016. A prospective view of animal and human Fasciolosis. *Parasite Immunology.* 38(9), 558–68.
- Dacie, J.V., Lewis, S.M. 1984. *Practical haematology sixth ed.* Churchill Livingstone, Edinburgh, Melbourne and New York. pp 24–36.
- Dalton, J.P. 1998. *Fasciolosis*. CABI Publishing. University Press. Cambridge. 544 p.
- Danaher, M., De Ruyck, H., Crooks, R.H.S., Dowling, G., O'Keeffe, M. 2007. Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices. *Journal of Chromatography B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 845(1), 1–37.
- Daniel, R., Van Dijk, J., Jenkins, T., Akca, A., Mearns, R., Williams D. J. L. 2012. Composite faecal egg count reduction test to detect resistance to triclabendazole in *Fasciola hepatica*. *Veterinary Record.* 171, 153.
- Davicino, R. A. 2002. *Residuos de Medicamentos Veterinarios, Anabólicos y plaguicidas en carne, leche y miel.* Departamento de salud pública. Facultad de Agronomía. Universidad de Rio Cuarto. Argentina.

- Dayan, A.D. 2003. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Trop.* May. 86(2-3), 141–159.
- De Ruyck, H, Daeseleire, E, De Ridder, H., Van Renterghem, R. 2002. Development and validation of a liquid chromatographic electrospray tandem mass spectrometric multiresidue method for anthelmintics in Milk. *Journal of Chromatography A.* 976, 181–194.
- Dean, J. H., Murray, M.J. 1991. Toxic responses to the immune system. In: Casarett and Doull's toxicology: The Basic Science of Poisons. Pergamon Press, New York, pp 282–333.
- Denžić, M., Pavliček D., Bilandžić, N., Majnarić, D. 2017. Residues and their metabolites in raw milk, *Mljekarstvo.* 67 (3), 231–238.
- EMA (European Medicines Agency). 1999. Committee for Veterinary Medicinal Products: Albendazole Oxide– summary report 2. Disponible en: <http://www.ema.europa.eu/docs/en-GB/document-library/Maximum-Residue-Limits-Report/2009/11/WC500009687.pdf>.
- EMA (European Medicines Agency). 2001. Committee for Veterinary Medicinal Products: Mebendazole – summary report 2. Disponible en: <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/078101en.pdf>.
- EMA (European Medicines Agency). 2004. Guideline on Harmonising the Approach to Causality Assessment for Adverse Reactions to Veterinary Medicinal Products. Disponible en: [http://www.ema.europa.eu/docs/GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/10/WC500004995.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004995.pdf).
- EMA (European Medicines Agency). 2004a. Committee for Veterinary Medicinal Products: Albendazole (Ex-trapolation to all ruminants) – summary report 3. Disponible en: <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/086503en.pdf>.
- European Food Safety Authority. 2012. Report for 2010 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. <http://www.efsa.europa.eu/fr/supporting/pub/212e>.
- EMA (European Medicines agency). 2014. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use European public MRL assessment report (EPMAR) Triclabendazole (all ruminants milk) – after the provisional maximum residue limit (MRL) [https://www.ema.europa.eu/documents/mrl-report/triclabendazole-all-ruminants-milk-european-public-maximum-residue-limit-assessment-report-epmar\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/mrl-report/triclabendazole-all-ruminants-milk-european-public-maximum-residue-limit-assessment-report-epmar_en.pdf).

- European Commission- EC. 2012. Commission staff working document on the implementation of national residue monitoring plans in the member states in 2009 (Council Directive 96/23/EC).
- European Commission- EC. (2014): Commission Implementing Regulation 676/2014/EC of 19 June 2014 amending Regulation (EU) No 37/2010, as regards the substance ‘triclabendazole’. Official Journal of the European Union L180, 5-7.
- Espinoza, J., Terashima, A., Herrera-Velit, P., Marcos, L.A. 2010. Fasciolosis humana y animal en el Perú: impacto en la economía de las zonas endémicas. Rev. perú. med. exp. salud pública. 27(4), 604–612.
- Fairweather, I., Boray J.C. 1999. Fasciolicides: Efficacy, Actions, Resistance and its Management. The Veterinary Journal. 158, 81–112.
- Fairweather, I. 2005. Triclabendazole: new skills to unravel and old(ish) enigma. J Helminthology. 79, 227–234.
- Fairweather, I. 2009. Triclabendazole progress report, 2005-2009: an advancement of learning? J Helminthol, 83, 139-50.
- FAO. 1993. Residues of some veterinary drugs in animals and foods. Food and Nutrition, Paper 41/5. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Flanagan, A. Edgar, H.W.J., Gordon, A., Hanna, R.E.B., Brennan, G.P., Fairweather, I. 2011. Comparison of two assays, a faecal egg count reduction test (FECRT) and a coproantigen reduction test (CRT), for the diagnosis of resistance to triclabendazole in *Fasciola hepatica* in sheep. Vet Parasitol. 176, 170–176.
- Fletouris, D.J., Botsoglou, N.A., Psomas, I.E., Mantis, A.I. 1998. Albendazole-related drug residues in milk and their fate during cheesemaking, ripening, and storage. J Food Prot. 61, 1484–1488.
- Flynn, R. J., Mulcahy, G., Welsh, M., Cassidy, J. P., Corbett, D., Milligan, C., Andersen, P., Strain, S., McNair, J. 2009. Co-Infection of cattle with *Fasciola hepatica* and *Mycobacterium bovis*- immunological consequences. Transbound Emerg Dis. 56, 269–274.
- Fulkerson, P.C., Rothenberg, M.E. 2013. Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond. Nat Rev Drug Discov.12(2):117-29. doi: 10.1038/nrd3838.
- Gattani, A., Kumar, A., Singh, G. D., Tiwary, R., Kumar, A., Kumar Das, A., Samantaray, S. 2015. Hemato biochemical Alteration in Naturally Infected Cattle

- with *Fasciola* under Tropical Region. *Research & Reviews: Journal of Veterinary Science and Technology*. Volume 4, Issue 1.
- Gimeno, E. J. 1997. Programa de control de residuos. CALIBA. Cámara Argentina de Laboratorios independientes, Bromatológicos). Argentina.
- Gómez, P. 2014. Situación actual de residuos de fármacos veterinarios en alimentos de origen animal en el Perú. Tesina para optar el Título de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- González, L.C., Esteban, J.G., Bargues, M.D., Valero, M.A., Ortiz, P., Náquira, C., 2011. Hyperendemic human fascioliasis in Andean valleys: an altitudinal transect analysis in children of Cajamarca province, Peru. *ActaTropica*. 120 (1-2), 119–129.
- Hacariz, O., Sayers, G., Flynn, R. J., Lejeune, A., Mulcahy, G. 2009. IL-10 and TGF-beta1 are associated with variations in fluke burdens following experimental fasciolosis in sheep. *Parasite Immunol*. 31, 613–622.
- Haroun, E.M., Hillyer, G.V. 1986. Resistance to Fascioliasis. A review. *Vet. Par*, 20:63–93.
- Hawkins, C.D., 1984. The use of haemoglobin, packed-cell volume and serum sorbitol dehydrogenase as indicators of the development of fascioliasis in sheep. *Vet. Parasitol*. 15, 125–133.
- Hennessy, D.R., Lacey, E, Steel, J.W., Prichard, R.K. 1987. The kinetic of triclabendazole disposition in sheep. *J Vet Pharmacol Therap*. 10: 64–72.
- Holmes, P.H., Dargie, J.D., MacLean, J.M., Mulligan, W. 1968. The anaemia in fascioliasis: Studies with <sup>51</sup>Cr-labelled red cells. *Journal of Comparative Pathology*. 78, 415–420.
- Hurt, M.E., Cappon, G.D., Browning, A. 2003. Proposal for a tiered approach to developmental toxicity testing for veterinary pharmaceutical products for food-producing animals. *Food and Chemical Toxicology*. 41, 611–9.
- Imperiale, F., Ortiz, P., Cabrera, M., Farias, C, Sallovitz, J, Iezzi, S, Pérez, J, Alvarez, L, Lanusse, C. 2011. Residual concentrations of the flukicidal compound triclabendazole in dairy cow's milk and cheese. *Food Additives and Contaminants*. 28(4), 438–445.
- Jedziniak, P., Olejnik, M., Rola J., Szprengier-Juszkiewicz, T. 2015. Anthelmintic residues in goat and sheep dairy products. *Bull Vet Inst Pulawy*. 59, 515–518.

- JOINT FAO/IAEA. 2016. Development of radiometric and allied analytical methods and strategies to strengthen national residue control programs for antibiotic and anthelmintic veterinary drug residues/International Atomic Energy Agency. Final Report of a coordinates research project. Series: IAEA TECDOC series, ISSN 1011–4289; N°. 1800.
- Kaufmann, A. Butcher, P., Maden, K., Walker, S., Widmer, M. 2011. Quantification of anthelmintic drug residues in milk and muscle tissues by liquid chromatography coupled to orbitrap and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Talanta*. 85 (2), 991–1000.
- Keegan, J., Whelana, M., Danaher, M., Crooks, S., Sayers, R., Anastasiof, A., Elliott, C., Brandon, D., Furey, A., O’Kennedy, R. 2009. Benzimidazole carbamate residues in milk: Detection by Surface Plasmon Resonance-biosensor, using a modified QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) method for extraction. *Analytica Chimica Acta*. 654, 111–119.
- Keegan, P.S., Trudgett, A. 1992. *Fasciola hepatica* in the rat: immune responses associated with the development of resistance to infection. *Parasite Immunology*. 14, 657–669.
- Kelley, J., Elliott, P., Beddoe, T., Anderson, G., Skuce, P., Spithill, T., 2016. Review Current Threat of Triclabendazole Resistance in *Fasciola hepatica*. *Trends in Parasitology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2016.03.002>
- Kinabo, L.D.B., Bogan, J.A. 1988. Pharmacokinetics and efficacy of triclabendazole in goats with induced fascioliasis. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 11, 254–259.
- Kinsella, B., Lehotay, S.J., Mastovska, K., Lightfield, A.R., Furey, A., Danaher, M. 2009. New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography– tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 637 (1–2), 196–207.
- Lacey, E., Brady, R.L., Prichard, R.K., Watson, T.R. 1987. Comparison of inhibition of polymerization of mammalian tubulin and helminth ovicidal activity by benzimidazole carbamates. *Vet Parasitol.* 23, 105–119.
- Lacey, E. 1988. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazole. *International Journal for Parasitology*. 18, 885–936.
- Lacey, E. 1990. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitology Today*. 6, 112–114.

- Lanusse, C. 2009. Pharmacological challenges to achieve sustainable anthelmintic control in ruminants. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 32 (1), 11–13.
- Lotfy, H.S., Mahmoud, S.M., Abdel-Gawad, M.A. 2003. Some Studies on Fascioliasis in Mid Egypt. *Agr Res*. 81(2), 209–27.
- Lotfy, W.M., Brant, S.V., DeJong, R.J., Le, T.H., Demiaszkiewicz, A., Rajapakse, R.P.V.J., Perera, V.B.V.P., Laursen, J.R., Loker, E.S. 2008. Evolutionary origins, diversification and biogeography of liver flukes (Digenea, Fasciolidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 79, 248–255.
- Lucas, 2016. Development of Radiometric and Allied Analytical Methods and Strategies to Strengthen National Residue Control Programs for Antibiotic and Anthelmintic Veterinary Drug Residues. Final Report of a Coordinated Research Project prepared by the JOINT FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. IAEA-TECDOC-1800. pp 186-192.
- Lucas, O., Olivos, H. 2010. Liquid Chromatography coupled to Quadrupole Mass Spectrometry Tandem (LC/MS/MS) and its Applications in the Analysis of Residuals of Nitrofurant Antibiotics in Chicken Muscles. Disponible en: <http://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/view/2608>.
- Maizels, R. M., McSorley, H. J. 2016. Regulation of the host immune system by helminth parasites, *J Allergy Clin Immunol*. 138, 666–75.
- McSorley, H.J., Hewitson, J.P, Maizels, R.M. 2013. Immunomodulation by helminth parasites: Defining mechanisms and mediators. *Int J Parasitol*. 43, 301–10.
- Martínez-Moreno, A., Jiménez, V., Martínez-Cruz, M.S., Martínez-Moreno, F.J., Becerra, Hernández, S. 1997. Triclabendazole treatment in experimental goat fasciolosis: anthelmintic efficacy and influence in antibody response and pathophysiology of the disease. *Vet Parasitol*. 68, 57–67.
- Martínez-Pérez, J.M., Robles-Pérez, D., Rojo-Vázquez, F.A., Martínez-Valladares, M. 2014. Immunological features of LPS from *Ochrobactrum intermedium* on sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Res.Vet. Sci*. 97, 329–332.
- Martínez-Pérez, J.M., Robles-Pérez, D., Valcárcel-Sancho, F., González-Guirado, A.M., Casanova-García de Castro, I., Nieto-Martínez, J.M., Rojo-Vázquez, F.A., Martínez-Valladares, M. 2013. Effect of lipopolysaccharide (LPS) from

- Ochrobactrum intermedium* on sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. Parasitol. Res. 112, 2913–2923.
- Martínez-Valladares, M., Famularo, M.R., Fernández-Pato, N., Castañón Ordóñez, L., Cordero-Pérez, C., Rojo-Vázquez, F.A. 2010. Efficacy of nitroxylinil against *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in a naturally infected sheep flock. Parasitol. Res. 107, 1205–1211.
- Mas-Coma, S., Bargues, M.D., Valero, M.A. 2005. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. International Journal for Parasitology. 35, 1255–1278.
- Mehlhom, H., Armstrong, P. 2001. Diseases, treatment and therapy. In Encyclopaedic reference of Parasitology, Mehlhom, H., ed. Berlin, Springer, p. 678.
- Mehmood, K., Zhang, H., Jawad, A., Zahid, R., Ijaz, M., Durrani, A., Saleem, M., Rehman, M., Kashif, M., Wang, Y., Ahmad, H, Abbas, T.R., Hussain, M. Ghori, Sadaqat, A., A. Khan, J. Li. 2017. A review on epidemiology, global prevalence and economical losses of fasciolosis in ruminants. Microbial Pathogenesis. 109, 253–262.
- Mekroud, A., Chauvin, A., Rondelaud, D. 2007. Variations of biological indicators as highly presumptive markers for fasciolosis in experimentally infected sheep. Rev. Med. Vet. 158, 437–441.
- Mendes, E., De Olivera, T., Lopes, S., Menezes-Sousa, D., Bartholomeu, D., Martins, I., 2013. Expression of IL-4, IL-10 and IFN- $\gamma$  in the liver tissue of cattle that are naturally infected with *Fasciola hepatica*. Vet Parasitol. 195, 177–182. doi: 0.1016/j.vetpar.2013. 03.035.
- Mestorino, N., Formentini, E. A., Lucas, M. F., Fernández, C., Modamio, P. Mariño Hernández, E., Errecalde, J. O. 2008. Pharmacokinetic disposition of triclabendazole in cattle and sheep; discrimination of the order and the rate of the absorption process of its active metabolite triclabendazole sulfoxide. Vet Res Commun. 32, 21–33.
- Michels, M., Meuldermanns, W., Heykants, J. 1987. The metabolism and fate of closantel (Flukiver) in sheep and cattle. Drug Metabolism Review. 18, 235–251.
- MINAGRI - Ministerio de Agricultura y Riego. 2014. Valor Bruto de la Producción Agropecuaria. Oficina de estudios económicos y estadísticos-OEE. Disponible en:  
<http://minagri.gob.pe/portal/download/pdf/herramientaboletines/boletineselectronicos/VBP/2014/VBPmarzo-2014.pdf>.

- Mitchell, G.B.B., Maris, L., Bonniwell, M.A., 1998. Triclabendazole-resistant liver fluke in Scottish sheep. *Vet. Rec.* 143, 399.
- Moreau, E., Chauvin, A., 2010. Immunity against helminths: interactions with the host and the intercurrent infections. *J. Biomed. Biotechnol.* Disponible en <http://dx.doi.org/10.1155/2010/428593>.
- Mottier, L., Virkel, G., Solana, H., Álvarez, L., Salles, J., Lanusse, C. E. 2004. Triclabendazole biotransformation and comparative diffusion of the parent drug and its oxidised metabolites into *Fasciola hepatica*. *Xenobiotica*. 34, 1043–1057.
- Mulcahy, G. 1999. Immunology of *Fasciola hepatica* Infection. En: J.P. Dalton (ed.) *Fasciolosis*, CABI Publishing, Cambridge UK, pp 341-376.
- Niell, S. Cesio, V., Hepperle, J., Roux, D., Kirsch, L., Kolberg, D., Anastassiades, M., Heinzen, H. 2013. Análisis multiresiduo de 41 pesticidas en miel por LC-MS/MS: evaluación de dos métodos de clean-up. *Agrociencia Uruguay*, 17(1), 101-107.
- Norma Técnica Peruana (NTP 202-001:2003, NTS N° 071-MINSA/DIGESA) para leche y productos lácteos.
- Novartis Animal Health. 2016. Publicly available assesment report for a veterinary medicinal product. Veterinary Medicines Directorate Woodham Lane. United Kingdom. Disponible en: [www.vmd.defra.gov.uk](http://www.vmd.defra.gov.uk).
- O'Brien, B., Jordan, K., Danaher, M. 2010. Update on the use of flukicides. *Irish Veterinary Journal* 63, 702–704
- Oliveira, R.C., Paschoal, J.A.R., Reyes, F.G.R. 2010. Streptomycin and dihydrostreptomycin residues on bovine milk from Brazilian retail market. *Food Addit. Contam. B.* 3,156–162.
- O'Neill, S.M., Brady, M.T., Callanan, J.J., Mulcahy, G., Joyce, P., Mills, K.H., Dalton, J.P. 2000. *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice. *Parasite Immunol.* 22, 147–155.
- Ortiz, P., Scarcella, S., Cerna, C, Rosales C., Cabrera, M., Guzmán, M., Lamenza, P., Solana, H. 2013. Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): A clinical trial and an in vivo efficacy test in sheep. *Vet Parasitol.* 195 (1-2), 118–121.
- Overend, D.J., Bowen, F.L. 1995. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Aust Vet J.* 72, 275–276.
- Pleasance, J., Raadsma, H. W., Estuningsih, S. E., Widjajanti, S., Meeusen, E., & Piedrafita, D. 2011. Innate and adaptive resistance of Indonesian Thin Tail sheep

- to liver fluke: A comparative analysis of *Fasciola gigantica* and *Fasciola hepatica* infection. *Vet Parasitol.* 178, 264–272.
- Pleasance, J., Wiedosari, E., Raadsma, H. W., Meeusen, E., Piedrafita, D. 2011a. Resistance to liver fluke infection in the natural sheep host is correlated with a type-1 cytokine response. *Parasite Immunology.* 33, 495–505.
- Poitou, I., Baeza, E., Boulard, C. 1993. Kinetic responses of parasite specific antibody isotypes, blood leucocyte pattern and lymphocyte subsets in rats during primary infestation with *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol.* 49, 179–190.
- Power, C., Whelan, M., Danaher, M., Bloemhoff, Y., Sayers, R., O’Brien, B., Furey, A., Jordan, K. 2013. Investigation of the persistence of triclabendazole residues in bovine milk following lactating-cow and dry-cow treatments. *Food Additives and Contaminants. Part A* 30, 1080–1086.
- Power, C., Danaher, M., Sayers, R., O’Brien, B., Clancy, C., Furey, A., Jordan, K. 2013a. Investigation of the migration of triclabendazole residues to milk products manufactured from bovine milk, and stability therein, following lactating cow treatment. *Journal of Dairy Science.* 96, 6223–6232.
- Power, C., Danaher, M., Sayers, R., O’Brien, B., Whelan, M., Furey, A., Jordan, K. 2013b. Investigation of the persistence of radoxanide residues in bovine milk and fate during processing. *Food Addit Contam Part A.* 30, 1087–1095.
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W., Constable, P.D. 2007. *Veterinary Medicine: A Textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*, 10th Edition. W.B. Saunders Company Ltd.
- Ramírez, T., Benítez-Bribiesca L., Ostrosky-Wegman P. Herrera L. 2001. In Vitro effects of Albendazole and Its Metabolites on the Cell Proliferation Kinetics and Micronuclei Frequency of Stimulated Human Lymphocytes. *Archives of Medical Research.* 32, 119–122.
- Rana, M. S., Lee, S. Y., Kang, H. J., Hur, S. J. 2019. Reducing Veterinary Drug Residues in Animal Products: A Review. *Food science of animal resources*, 39(5), 687–703. doi:10.5851/kosfa.2019.e65.
- Resolución Directoral N° 0050-2015-MINAGRI-SENASA-DIAIA. 2015. Plan Anual de Monitoreo de Residuos Químicos y otros Contaminantes en Alimentos Agropecuarios Primarios y Piensos, para el periodo abril 2015 a marzo 2016.

- Reyna, G., Palacios, S. 2014. Determinación de residuos de triclabendazol en leche fresca y queso mantecoso que se destina a consumo humano mediante HPLC, en el distrito de Cajamarca-Perú. *Fiat Lux* 10(2), 41–50.
- Riviere, J., Papich, M. 2018. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Tenth Edition. Edited by Willey Blackwell. Published by Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Robles-Pérez, D., García-García, P., Martínez-Pérez, J.M., Rojo-Vázquez, F.A., Martínez-Valladares, M. 2014. Analysis of genetic variability of *Fasciola hepatica* populations from different geographical locations by ISSRPCR. *Parasitology*. 142(4), 527–533.
- Robles-Pérez, D., Martínez-Pérez, J. M., Rojo-Vázquez, F. A., y Martínez-Valladares, M. 2014a. Development of an egg hatch assay for the detection of anthelmintic resistance to albendazole in *Fasciola hepatica* isolated from sheep. *Vet Parasitol*. 203, 217–221.
- Robles-Pérez, D. 2015. Nuevas técnicas para el estudio de cepas ovinas de *Fasciola hepatica* con diferente origen y grado de resistencia a fármacos antihelmínticos. Memoria presentada para optar al grado de Doctor. Universidad de León. España. <http://digital.csic.es/handle/10261/126988>.
- Rodríguez, C. Rivera, J. Del Valle M., Cerna, C. Hoban C., Chilón, S., Ortiz, P. 2018. Risk factors for human fascioliasis in schoolchildren in Baños del Inca, Cajamarca, Perú. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 112, 216–222.
- Rojas, J. 2012. Resistencia de *Fasciola hepatica* al Triclabendazol en bovinos de Cajamarca – Perú. <http://www.engormix.com/MAGanaderiacarne/sanidad/articulos/resistencia-Fasciola-hepatica-triclabendazol-t4052/165-p0.htm>.
- Roland, L., Drillich, M., Iwersen, M. 2014. Hematology as a diagnostic tool in bovine medicine. *J. Vet. Diagnostic Investigation*. 26, 592–598.
- Ross, J.G. 1966. Experimental infection of cattle with *Fasciola hepatica*. Challenge infections. *Nature*. 212, 1464–1465.
- Ruiz-Campillo, M.T., Molina Hernández, V., Escamilla A., Stevenson, M., Pérez J, Martínez-Moreno, A., Donnelly, S., Dalton J., Cwiklinski, K. 2017. Immune signatures of pathogenesis in the peritoneal compartment during early infection of sheep with *Fasciola hepatica*. *Scientific Reports*7:2782. DOI:10.1038/s41598-017-03094-0.

- Schalm, O., Weiss, D., Wardrop, J. 2010. Schalm's Veterinary Hematology. 2010. 6th ed. Editors, Douglas J. Weiss, K. Jane Wardrop. Blackwell Publishing Ltd.
- Schmidt, G. D., Roberts, L. S. 2000. Trematoda: From Function, and Classification of Digeneans Foundation of Parasitology, McGraw-Hill, New York, NY, USA, 6th edition.
- Selgrade, M.K., Cooper, K.D., Devlin, R., Van Loveren, H, Biagini, R.E., Luster, M.I. 1995. Immunotoxicity - Bridging the Gap Between Animal Research and Human Health Effects. *Fundam. Appl. Toxicol.* 24, 13–21.
- SENASA. 2007. Informe Anual, diciembre. Servicio Nacional de Sanidad Agraria, Cajamarca, Perú.
- Shrimali, R. G., Patel, M. D., Patel, R. M. 2016. Comparative efficacy of anthelmintics and their effects on hematobiochemical changes in fasciolosis of goats of South Gujarat. Available at [www.veterinaryworld.org/Vol.9/May-2016/16.pdf](http://www.veterinaryworld.org/Vol.9/May-2016/16.pdf).
- Sinclair, K.B. 1975. The resistance of sheep to *Fasciola hepatica*: studies on the pathophysiology of challenge infections. *Rs. Vet. Sci.* 19(3), 296–303.
- Skuce, P.J., Zadoks, R.N., 2013. Liver fluke – A growing threat to UK livestock production. Moredun Research Institute, Pentlands Science Park, Bush Loan, Penicuik, EH26 0PZ. Vol 21. 2.
- Smyth, J. y Halton, D. 1983. *The Physiology of Trematodes*. Second Edition, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Soulsby, E.J.L. 1982. *Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals*, 7th Edition. Bailliere Tindall, London, 809 p.
- Soun, S., Hol., D., Siek, S., Mclean, M. 2006. Seasonal differences in the incidence of infection with *Fasciola gigantica* in Cambodian cattle. *Trop. Anim. Health Prod.* 38, 23–28.
- Spithill, T.W., Smooker, P.M., Sexton, J.L., Bozas, E., Morrison, C.A., Creaney, J. Y., Parson J.C. 1999. Development of Vaccines Against *Fasciola hepatica*. En: J.P. Dalton (ed.) *Fasciolosis*, CABI Publishing, Cambridge UK, pp 465- 526.
- Steinbach, T., Bauer, C., Sasse, H., Baumgartner, W., Rey-Moreno, C., Hermosilla, C., Damriyasa, I.M., Zahner, H. 2006. Small strongyle infection: consequences of larvicidal treatment of horses with fenbendazole and moxidectin. *Vet. Parasitol.* 139, 115–131.

- Stitt, A.W., Fairweather, I. 1994. The effect of the sulphoxide metabolite of triclabendazole ('Fasinex') on the tegument of mature and immature stages of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology*. 108, 555–567.
- Stitt, A.W., Fairweather, I., Mackerder, R.O. 1995. The effect of triclabendazole ("Fasinex") on protein synthesis by the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *International Journal for Parasitology*. 25, 421–9.
- Sykes, A.R., Coop, R.L., Rushton, B. 1980. Chronic subclinical fascioliasis in sheep: effects on food intake, food utilization and blood constituents. *Res Vet Sci*. 28, 63–70.
- Tajick, M.A, Shohreh, B. 2006. Detection of antibiotics residue in chicken meat using TLC. *Int 613 J Poult Sci* 5: 611-612.
- Takeba, K., Fujinuma, K., Sakamoto, M., Miyazaki, T., Oka, H., Itoh, Y., Nakazawa, H. 2000. Simultaneous determination of triclabendazole and its sulfoxide and sulfone metabolites in bovine milk by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 882, 99–107.
- Taylor, M., 2000. Use of anthelmintics in cattle. In *Practice*. 290, 304–38.
- Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L., 2007. *Veterinary Parasitology*, 3rd Edition. Blackwell Publishing Ltd., Oxford.
- Teruel, M., García, V., Catalano, R. 2009. Effects of Albendazole Sulphoxide on Embryonic, Foetal and Placental Parameters in Wistar Rats. *Int. J. Morphol.* 27(4), 1147–1153.
- Tliba, O., Moire, N., Le Vern, Y., Boulard, C., Chauvin, A., Sibille, P. 2002. Early hepatic immune response in rats infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Research*. 33, 261–270.
- Torgerson, P., Claxton, J. 1999. Chapter 4, Epidemiology and control. In Dalton, J. P. *Fasciolosis* CAB publishing, Wallington, 113–139.
- Torrel, S., Rojas, M., Rojas, J., Huamán, O. 2014. Prevalencia conjunta de Paranfistomosis y Fasciolosis en bovino lechero del valle de Cajamarca. Disponible en:<http://mrojas.perulactea.com>.
- Tsiboukis, D., Sazakli, E., Jelastopulu, E., Leotsinidis, M. 2013. Anthelmintics residues in raw milk. Assessing intake by a children population. *Pol J Vet Sci*. 16, 85–91.
- Urquhart, G., Armour, J., Duncan, J., Duna, A., Jennings, F. 2001. *Parasitología Veterinaria*. 2ª ed. p 239-276; 305-306. Editorial Acribia. Zaragoza.

- Viallard, J.F., Pellegrin, J.L., Ranchin, V., Schaefferbeke, T., Dehais, J., Longy-Boursier, M., Ragnaud, J.M., Leng, B., Moreau, J.F. 1999. Th1 (IL-2, interferon-gamma (IFN-gamma) and Th2 (IL-10, IL-4) cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin. Exp. Immunol.* 115, 189–195.
- Virkel, G., Lifschitz, A., Sallovitz, J, Pis, A., Lanusse, C. 2006. Assessment of the main metabolism pathways for the flukicidal compound triclabendazole in sheep. *J Vet Pharmacol Ther.* 29, 213–223.
- Waldvogel, A., Lepage, M.F., Zakher, A., Reichel, M.P., Eicher, R., Heussler, V. 2004. Expression of interleukin 4, interleukin 4 splice variants and interferon gamma mRNA in calves experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 97, 53–63.
- Whelan, M., Chirollo, C., Furey, A., Cortesi, M.L., Anastasio, A., Danaher, M. 2010. Investigation of the persistence of levamisole and oxcyclozanide in milk and fate in cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 58, 12204–12209.
- WHO (World Health Organization). 2007. Report of the WHO informal meeting on use of triclabendazole in fascioliasis control. WHO/CDS/NTD/PCT/2007.
- WHO (World Health Organization). 2015. Safety Monitoring of Medicinal Products: Guidelines for Setting Up and Running a Pharmacovigilance Centre. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jh2934e/14.html>.
- Wiedosari, E., Hayakawa, H., Copeman, B. 2006. Host differences in response to trickle infection with *Fasciola gigantica* in buffalo, Ongole and Bali calves. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 38, 43–53.
- Wood, I.B., Amaral, N.K., Bairden, K., Duncan, J.L., Kassai, T., Malone, J.B., Pankavich, J.A., Reinecke, R.K., Slocombe, O., Taylor, S.M., Vercruyse, J., 1995. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Vet. Parasitol.* 58, 181–213.
- Yoshimura, H. 1987. Teratogenic evaluation of triclabendazole in rats. *Toxicology.* 43:283-7.
- Young, K., Garza, K., Snowden, K., Dobson, R.J., Powel, D., Craig, T.M., 1999. Parasite diversity and anthelmintic resistance in two herds of horses. *Vet. Parasitol.* 85, 205–214.

- Zafra, R., Perez-Ecija, R.A, Buffoni, L., Pacheco, I.L., Martinez-Moreno, A., LaCourse, E.J., Perally, S., Brophy, P.M., Pérez, J. 2013. Early hepatic and peritoneal changes and immune response in goats vaccinated with a recombinant glutathione transferase sigma class and challenged with *Fasciola hepatica*. *Research in Veterinary Science*. 94, 602–609.
- Zhang, Z.W.Y., Moreau, E., Hope, J.C., Howard, C.J., Huang, W.Y., Chauvin, A. 2005. *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*: comparison of cellular response to experimental infection in sheep. *Exp Parasitol*. 111, 154–59.

# **ANEXOS**

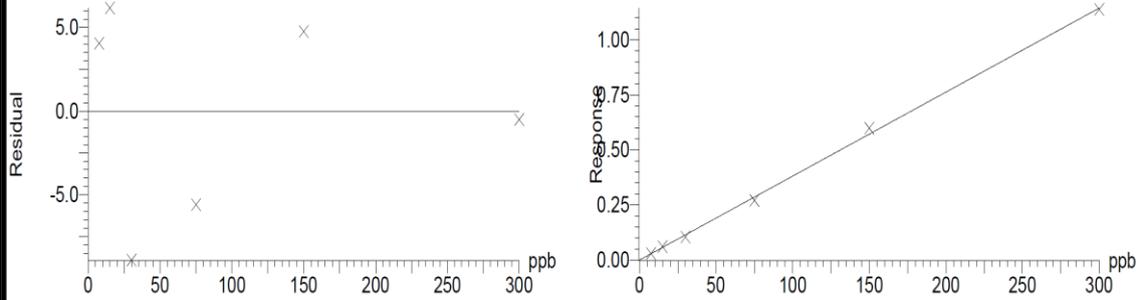
**Anexo 1.** Resultados de Recuperación, Repetibilidad del método LC-MS/MS en el laboratorio para leche bovina.

Analito	Nivel de Fortificación (µg/kg)	Recuperación % (n = 6 repetición por nivel)								Aceptable Rango *	
		Día 1		Día 2		Día 3		REC	REP	REC	REP
		Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD
TCBZ	50.0	96.4	7.4	81.7	10.6	95.6	5.0	91.2	9.0		<17
	100	82.5	6.7	77.3	4.9	86.9	3.4	82.2	5.9	80-110	<15
	150	78.8	5.9	69.1	5.4	88.1	18.4	78.7	12.1		<14
TCBZ-SO <sub>2</sub>	50.0	96.1	8.6	88.2	11.1	92.2	5.5	92.2	4.2		<17
	100	91.3	8.8	75.4	3.9	91.3	3.7	86.0	10.7	80-110	<15
	150	89.2	5.2	69.4	5.0	110	19.9	89.6	22.9		<14
TCBZ-SO	50.0	85.9	8.5	68.5	12.8	83.5	4.3	79.3	11.9		<17
	100	73.9	7.8	64.1	5.6	79.4	4.3	72.5	10.7	80-110	<15
	150	74.4	4.5	59.7	6.1	91.6	22.3	75.2	21.3		<14
TBZ	50.0	88.9	7.4	62.8	16.4	64.6	4.2	72.1	20.2		<17
	100	78.5	5.9	56.2	11.8	69.6	6.3	68.1	16.5	80-110	<15
	150	79.2	5.0	50.2	4.4	82.5	26.9	70.6	25.2		<14
ABZ	50.0	105.0	6.7	94.2	12.2	108	4.3	102.3	7.0		<17
	100	86.3	7.5	88.0	4.7	100	4.2	91.5	8.3	80-110	<15
	150	83.3	7.2	80.3	4.5	106	25.6	89.9	15.7		<14
ABZ-SO <sub>2</sub>	50.0	100.2	8.0	42.9	26.4	80.5	8.2	74.5	39.1		<17
	100	67.3	10.1	62.9	4.2	76.9	6.9	69.0	10.3	80-110	<15
	150	66.7	9.5	72.3	6.6	60.9	37.3	66.6	8.6		<14
ABZ-SO	50.0	115.3	7.7	67.2	14.8	115	6.0	99.0	27.8		<17
	100	80.7	8.9	80.6	4.4	97.0	5.4	86.1	11.0	80-110	<15
	150	66.7	7.5	72.3	4.9	60.9	36.8	66.6	8.6		<14
	50.0	84.8	10.6	78.3	10.5	92.7	8.1	85.3	8.5		<17

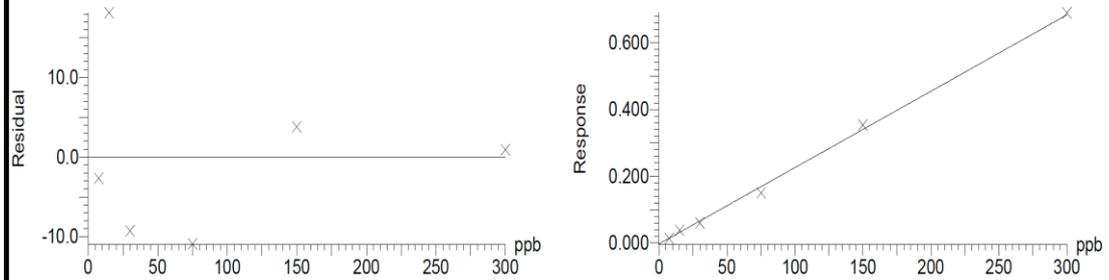
**Anexo 2.** Curvas de calibración fortificada en matriz: Std. Conc: ppb (ng/g). Curvas de Calibración para los metabolitos TCBZ, TCBZ SO, TCBZ SO<sub>2</sub>, ABZ, ABZSO, ABZSO<sub>2</sub>.

13.11.15-Anth-St1 Standard 7.500
13.11.15-Anth-St2 Standard 15.000
13.11.15-Anth-St3 Standard 30.000
13.11.15-Anth-St4 Standard 75.000
13.11.15-Anth-St5 Standard 150.000
13.11.15-Anth-St6 Standard 300.000

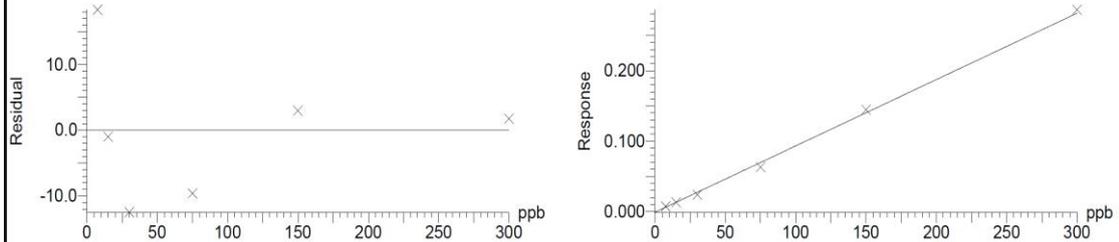
Compound name: Triclabendazol  
Correlation coefficient:  $r = 0.998983$ ,  $r^2 = 0.997967$   
Calibration curve:  $0.00381547 * x + 0.000347384$   
Response type: Internal Std ( Ref 1 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



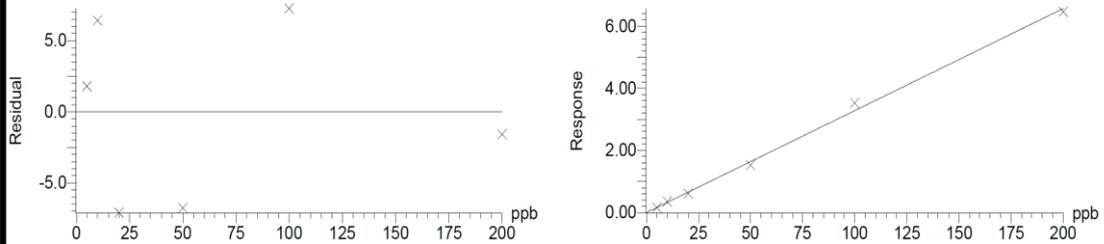
Compound name: Triclabendazol sulfona  
Correlation coefficient:  $r = 0.997844$ ,  $r^2 = 0.995692$   
Calibration curve:  $0.00228672 * x + -0.00238656$   
Response type: Internal Std ( Ref 1 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



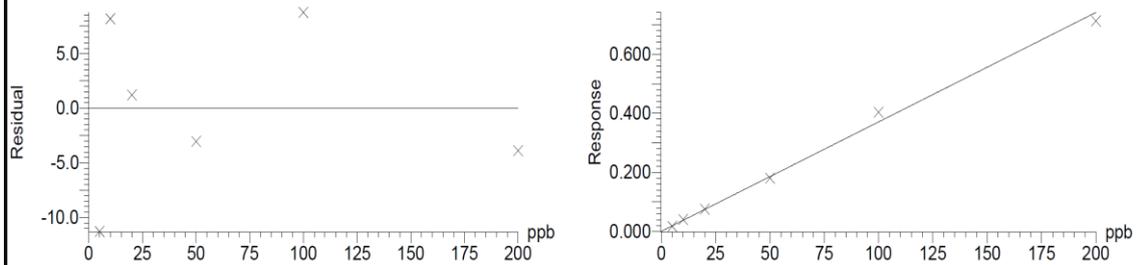
Compound name: triclabendazol sulfóxido  
Correlation coefficient:  $r = 0.998128$ ,  $r^2 = 0.996260$   
Calibration curve:  $0.000941589 * x + -0.000902916$   
Response type: Internal Std ( Ref 1 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



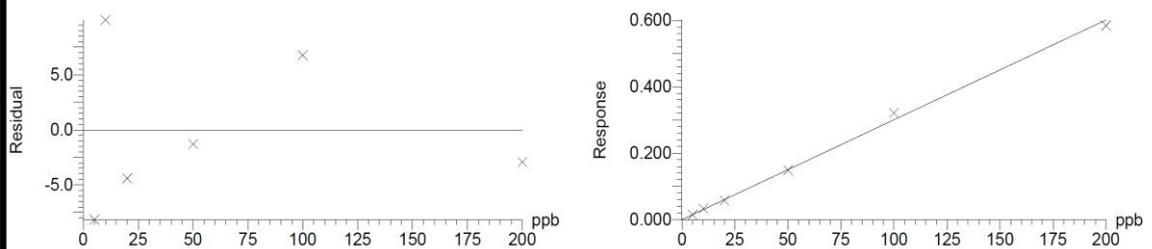
Compound name: Albendazol  
Correlation coefficient:  $r = 0.998374$ ,  $r^2 = 0.996751$   
Calibration curve:  $0.0328443 * x + -0.0014851$   
Response type: Internal Std ( Ref 1 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



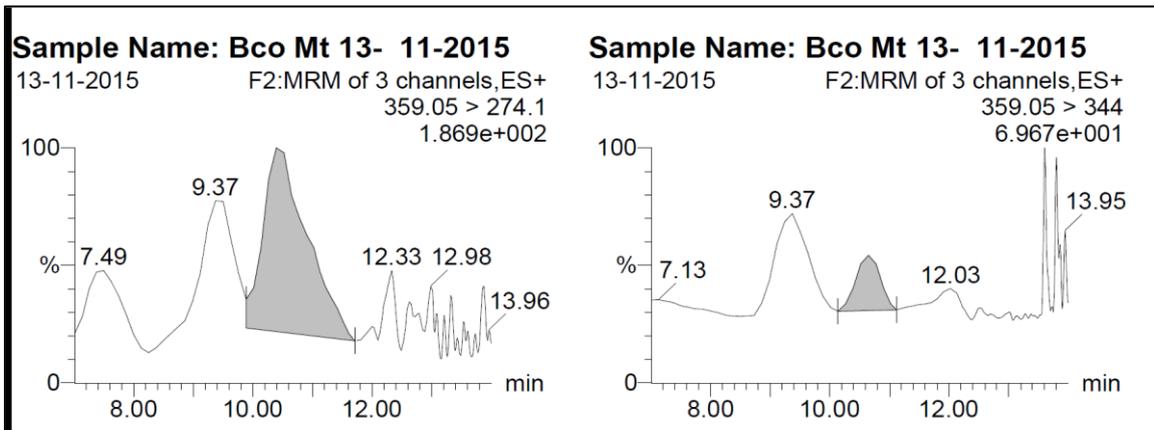
Compound name: Albendazol sulfona  
Correlation coefficient:  $r = 0.997863$ ,  $r^2 = 0.995730$   
Calibration curve:  $0.0037029 * x + 0.0007031$   
Response type: Internal Std ( Ref 1 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



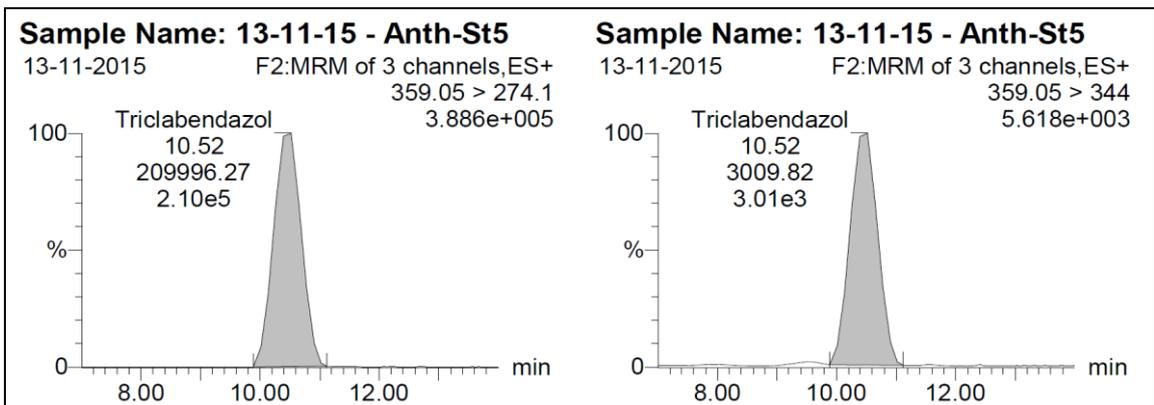
Compound name: Albendazol sulfoxido  
Correlation coefficient:  $r = 0.998614$ ,  $r^2 = 0.997230$   
Calibration curve:  $0.0030051 * x + -9.76051e-006$   
Response type: Internal Std ( Ref 1 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



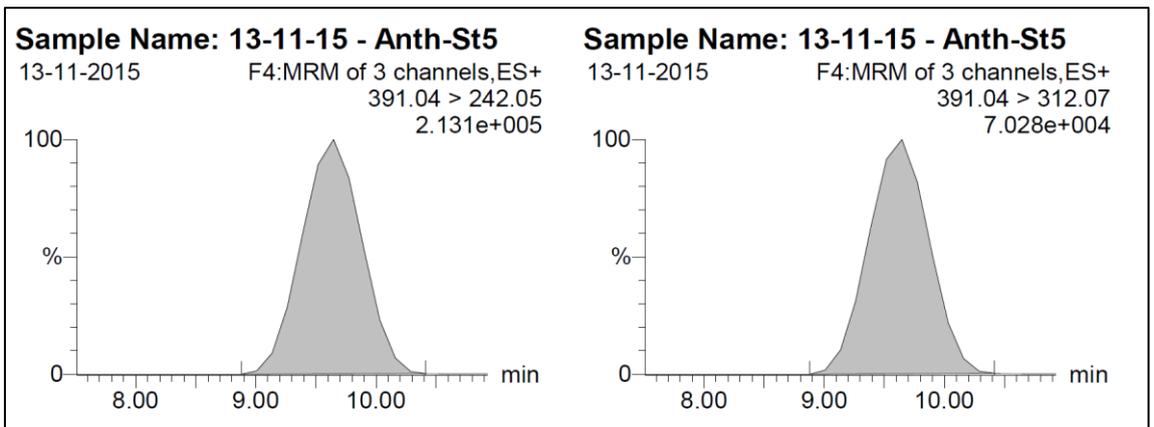
**Anexo 3:** Cromatogramas iónicos LC-MSMS de (1) Blanco de matriz (leche), y (2) Estándar fortificado en matriz, incluyendo las dos transiciones MRM (Cuantificación y Confirmación) para analito TCBZ.



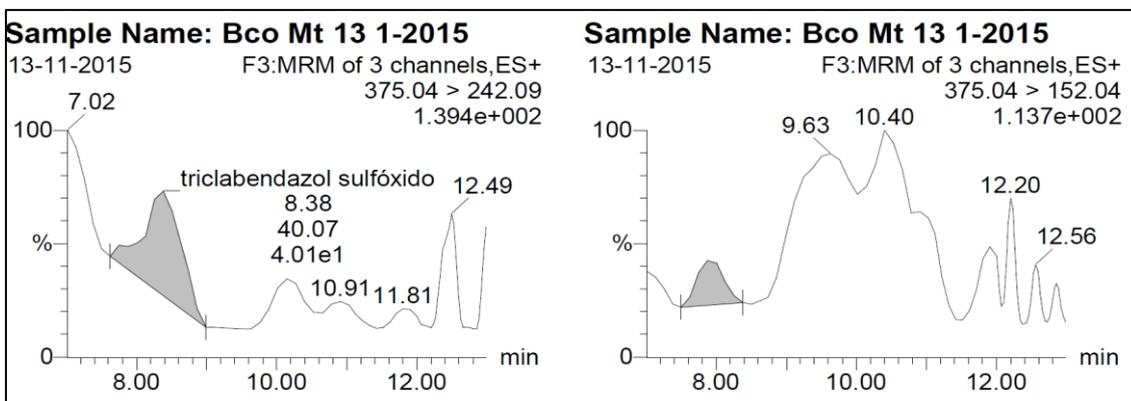
**Anexo 4:** Cromatogramas iónicos LC-MSMS de (1) Blanco de matriz (leche), y (2) Estándar fortificado en matriz, incluyendo las dos transiciones MRM (Cuantificación y Confirmación) para cada analito TCBZ.



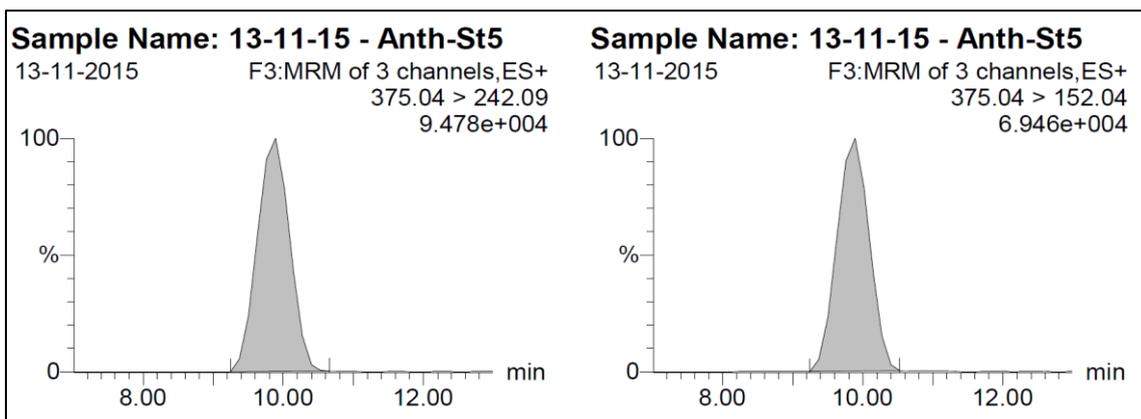
**Anexo 5:** Cromatogramas iónicos LC-MSMS de (1) Blanco de matriz (leche), y (2) Estándar fortificado en matriz, incluyendo las dos transiciones MRM (Cuantificación y Confirmación) estándar para analito TCBZSO2



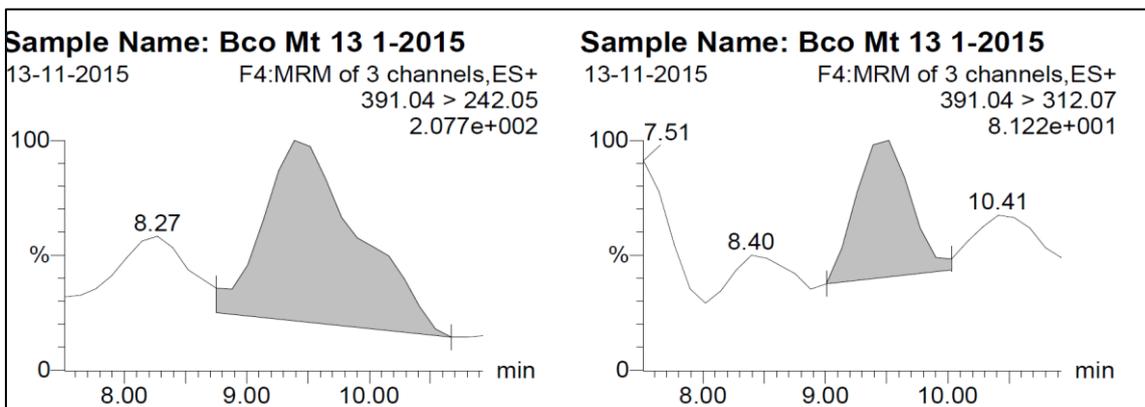
**Anexo 6:** Cromatogramas iónicos LC-MSMS de (1) Blanco de matriz (leche), y (2) Estándar fortificado en matriz, incluyendo las dos transiciones MRM (Cuantificación y Confirmación) para cada analito TCBZSO.



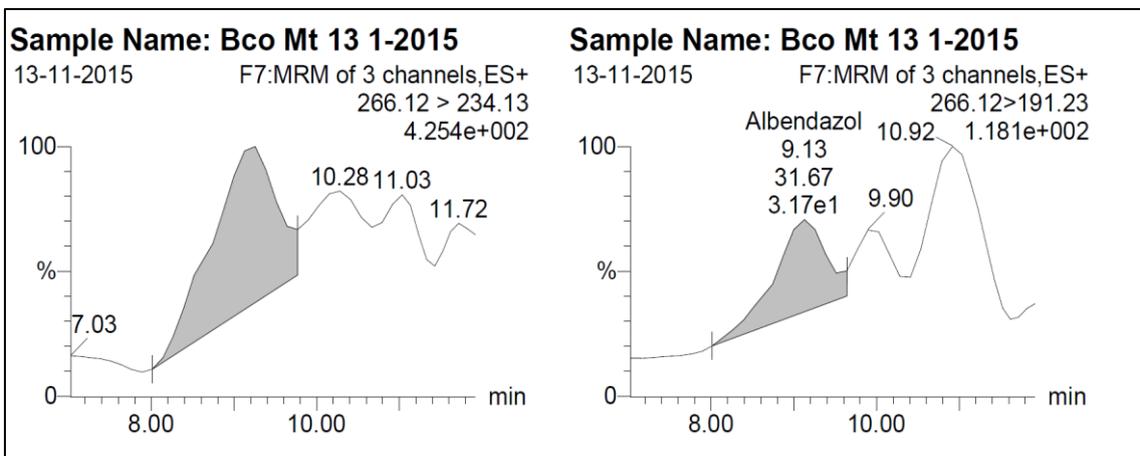
**Anexo 7:** Cromatogramas iónicos LC-MSMS de (1) Blanco de matriz (leche), y (2) Estándar fortificado en matriz, incluyendo las dos transiciones MRM (Cuantificación y Confirmación) para standard para analito ABZ.



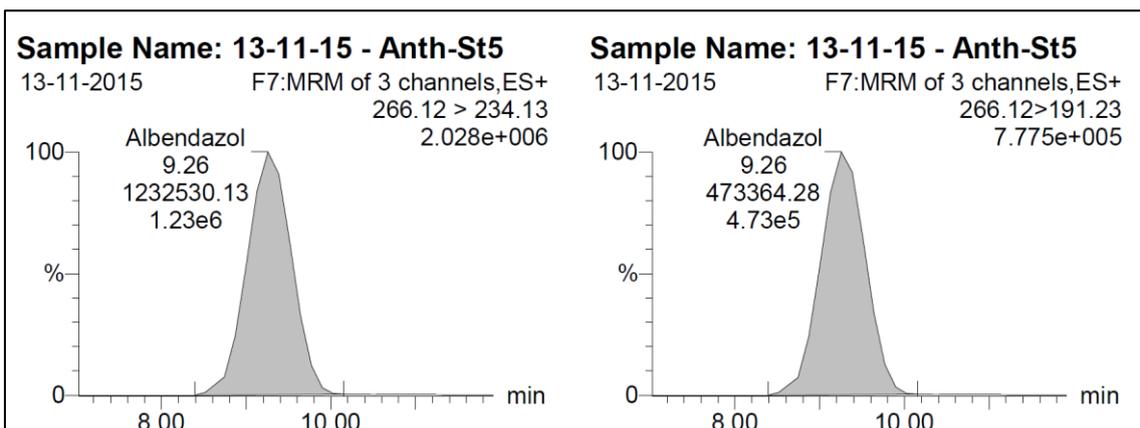
**Anexo 8:** Cromatogramas iónicos LC-MSMS de (1) Blanco de matriz (leche), y (2) Estándar fortificado en matriz, incluyendo las dos transiciones MRM (Cuantificación y Confirmación) blanco para analito ABZ.



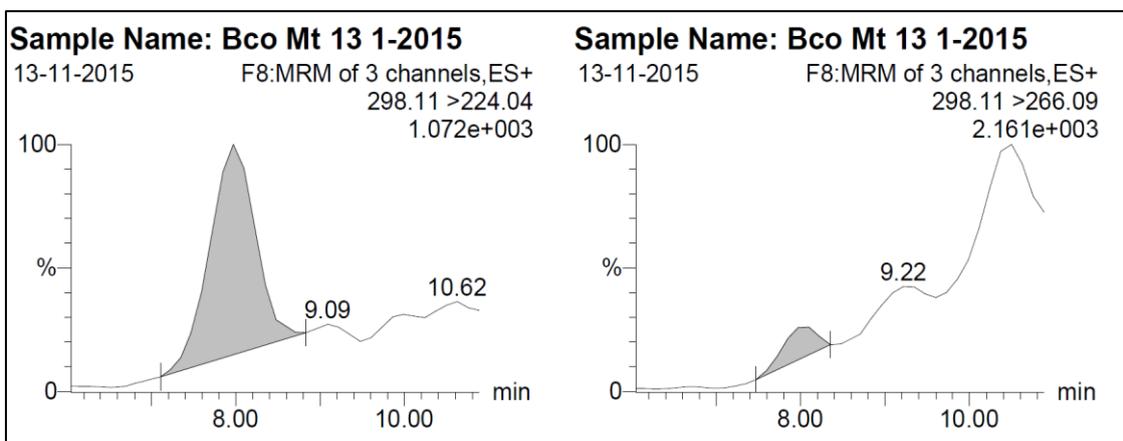
**Anexo 9:** Cromatogramas iónicos LC-MSMS de (1) Blanco de matriz (leche), y (2) Estándar fortificado en matriz, incluyendo las dos transiciones MRM (Cuantificación y Confirmación) para cada analito blanco y ABZ.



**Anexo 10:** Cromatogramas iónicos LC-MSMS de (1) Blanco de matriz (leche), y (2) Estándar fortificado en matriz, incluyendo las dos transiciones MRM (Cuantificación y Confirmación) estándar para analito ABZ.

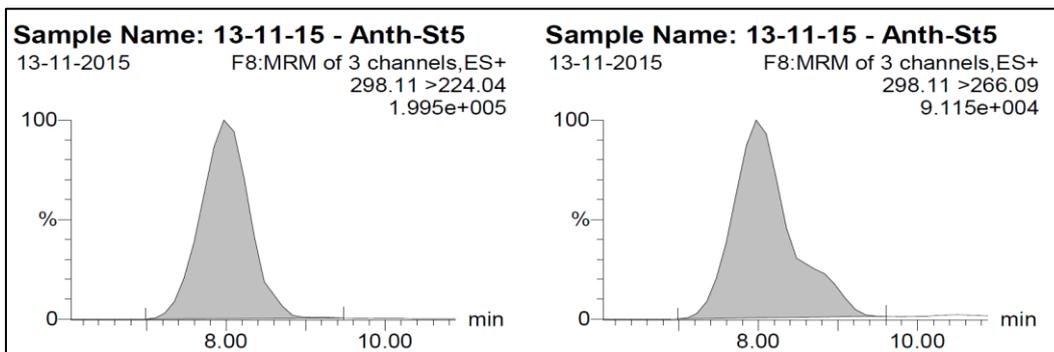


**Anexo 11:** Cromatogramas iónicos LC-MSMS de (1) Blanco de matriz (leche), y (2) Estándar fortificado en matriz, incluyendo las dos transiciones MRM (Cuantificación y Confirmación) blanco para blanco ABZSO<sub>2</sub>



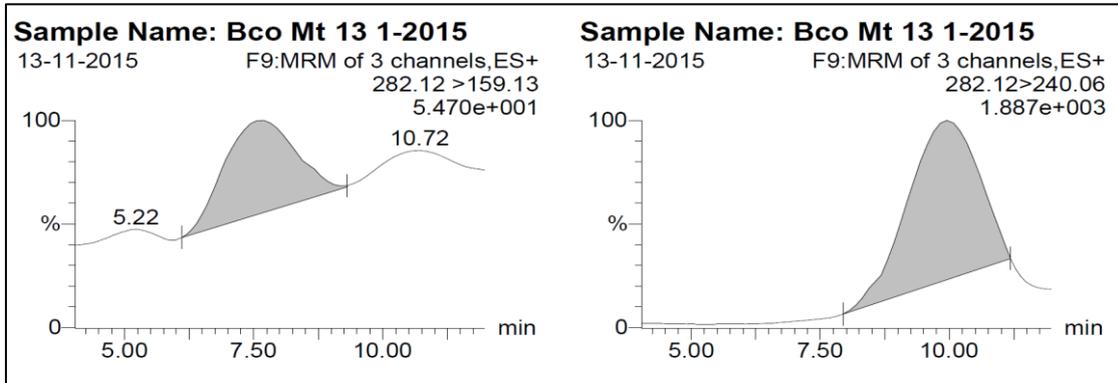
**Anexo 12:** Cromatogramas iónicos LC-MSMS de (1) Blanco de matriz (leche), y (2) Estándar fortificado en matriz, incluyendo las dos transiciones MRM (Cuantificación y Confirmación) para cada analito.

Albendazol sulfona.

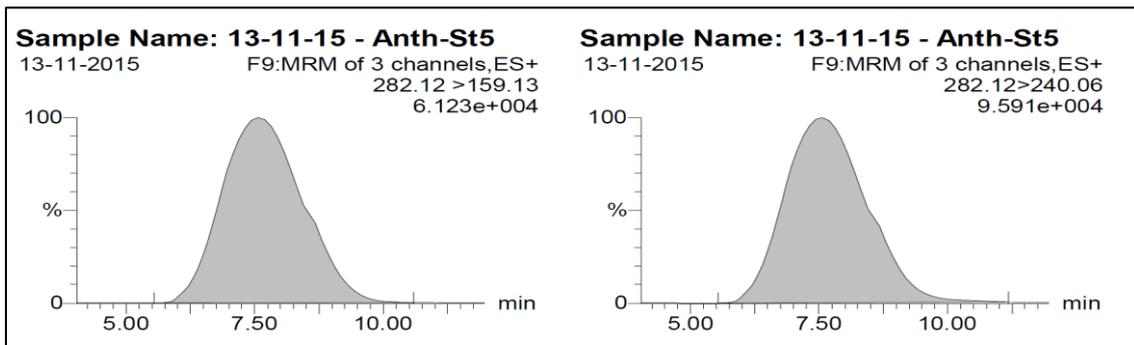


**Anexo 13:** Cromatogramas iónicos LC-MSMS de (1) Blanco de matriz (leche), y (2) Estándar fortificado en matriz, incluyendo las dos transiciones MRM (Cuantificación y Confirmación) para cada analito ABZSO.

Albendazol sulfóxido.



**Anexo 14:** Cromatogramas iónicos LC-MSMS de (1) Blanco de matriz (leche), y (2) Estándar fortificado en matriz, incluyendo las dos transiciones MRM (Cuantificación y Confirmación) para cada analito.



**Anexo 15.** Porcentaje y Frecuencia de TCB, ABZ y FBZ, en leches crudas de bovinos de acuerdo a procedencia de las zonas de comercialización en el distrito de Cajamarca.

N°	Zona de Muestreo	Muestras positivas		Muestras Negativas		Total Muestras	
		N	%	n	%	N	%
1	MC La Mar	1	14.28	4	17.39	5	16.66
2	MC Apurímac	1	14.28	3	13.05	4	13.34
3	MC Amazonas	1	14.28	3	13.05	4	13.34
4	Parada 11 Febrero	3	42.85	2	8.69	5	16.66
5	Huacariz	1	14.28	3	13.05	4	13.34
6	Sucre	-		2	8.69	2	6.66
	Independencia						
7	Mdo Santa Rosa	-		2	8.69	2	6.66
8	Parada Revilla	-		4	17.39	4	13.34
	Pérez						
Total		7		23		30	

**Anexo 16:** Concentración de los analitos ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) fenbendazol (FBZ), mebendazol (MBZ), praziquantel (PZQ) y tiabendazol (TBZ) encontrados en las muestras de leche y el LMR correspondiente.

N°	Matriz	FBZ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	MBZ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	PZQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	TBZ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
01	15	100.2	-	-	-
LMR		100			
		( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )			

**Anexo 17:** Parámetros hematológicos: Eritrocitos, leucocitos y recuentos diferenciales ( $\pm$ D.S.) de ovinos infectados con *F. hepatica* y tratados con TCBZ y sus controles

Muestreo PI	Eritrocitos ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )		Hematocrito (%)		Leucocitos ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )		Neutrófilos (%)		Eosinófilos (%)		Linfocitos (%)		Monocitos (%)		Basófilos (%)	
	Tratam	control	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C
1	9.6 $\pm$ 1.8	9.88 $\pm$ 2.3	39.8 $\pm$ 4.4	33.1 $\pm$ 2.9	9.4 $\pm$ 3.4	8.23 $\pm$ 3	5.1 $\pm$ 2.1	19 $\pm$ 9.4	1.5 $\pm$ 1.0	1.8 $\pm$ 2.4	92.2 $\pm$ 3.6	73.3 $\pm$ 12	2.1 $\pm$ 1.3	5.8 $\pm$ 2.9	0 $\pm$ 0	0
2	10.47 $\pm$ 1.54	10.03 $\pm$ 2.6	35.8 $\pm$ 3.9	39.25 $\pm$ 3	7.43 $\pm$ 3.2	7.46 $\pm$ 2.8	5.25 $\pm$ 2.4	20.8 $\pm$ 11	1.5 $\pm$ 2.1	1.8 $\pm$ 2.4	91.5 $\pm$ 5.4	72.6 $\pm$ 12	2 $\pm$ 1.5	7 $\pm$ 4.6	0.12 $\pm$ 0.3	0
3	8.03 $\pm$ 1.08	10.37 $\pm$ 2.5	31.6 $\pm$ 2.3	39.4 $\pm$ 3	7.14 $\pm$ 4.2	7.48 $\pm$ 1.3	12.25 $\pm$ 9.9	14.1 $\pm$ 10	4.3 $\pm$ 5.2	1.5 $\pm$ 2.3	79 $\pm$ 1.1	81.8 $\pm$ 13.6	4.3 $\pm$ 2	2.5 $\pm$ 1.8	0	0
4	7.75 $\pm$ 1.5	11.20 $\pm$ 3.1	28.9 $\pm$ 1.3	40 $\pm$ 4.1	6.55 $\pm$ 3.3	7.75 $\pm$ 1.1	6.25 $\pm$ 8.2	11.6 $\pm$ 8.7	5.1 $\pm$ 3.3	2.6 $\pm$ 3.6	85 $\pm$ 9.1	80.1 $\pm$ 11.1	3.6 $\pm$ 2.7	4 $\pm$ 4.1	0	0
5	8.57 $\pm$ 1.2	9.26 $\pm$ 4.6	30.81 $\pm$ 3.9	9.8 $\pm$ 3.3	6.06 $\pm$ 2.5	7.88 $\pm$ 1.3	14.25 $\pm$ 8.6	3.3 $\pm$ 3.8	4.75 $\pm$ 2.7	0	79.8 $\pm$ 9.0	92.3 $\pm$ 6	1.6 $\pm$ 1	4.3 $\pm$ 2.8	0	0
6	9.74 $\pm$ 1.2	11.51 $\pm$ 2.3	30.5 $\pm$ 1.7	40.08 $\pm$ 3.4	5.31 $\pm$ 1.9	7.97 $\pm$ 2.7	20.3 $\pm$ 7.5	12.6 $\pm$ 6	6.6 $\pm$ 3.2	2.8 $\pm$ 2	68.3 $\pm$ 1.1	80.6 $\pm$ 8.9	4.6 $\pm$ 3.2	3.8 $\pm$ 2.4	0	0
7	8.95 $\pm$ 1.4	11.0 $\pm$ 3	27.8 $\pm$ 1.6	40.5 $\pm$ 3.9	6.58 $\pm$ 3	8.05 $\pm$ 2.7	20 $\pm$ 9.1	18.3 $\pm$ 13	8.8 $\pm$ 5.5	3.3 $\pm$ 4.8	71.1 $\pm$ 10.1	74.8 $\pm$ 16	6.75 $\pm$ 2	4 $\pm$ 2.5	0	0
8	7.67 $\pm$ 8.4	11.27 $\pm$ 2.9	27 $\pm$ 1.4	40.6 $\pm$ 4.1	5.64 $\pm$ 2.2	8.03 $\pm$ 1.8	21.13 $\pm$ 11	14.1 $\pm$ 5.5	7.3 $\pm$ 6.3	0	67.3 $\pm$ 15	81.6 $\pm$ 7	4.13 $\pm$ 2	4.1 $\pm$ 3	0	0

9	8.71±1.1	10.87±3.2	30.4±2.6	40.5±4.3	7.10±2.7	8.41±1.3	17.1±9.2	12.5±4.9	3.87±4	0	67.25±6.3	83.3±4.4	11.7±4.4	4.1±3	0	0
10	7.05±2	11.68±2.1	27.5±2.2	40±3.1	8.15±3.2	9.73±3.6	28±14	12.8±7.5	6.6±3.8	2±2.1	59.6±17	82.6±9.8	5.7±2.2	2.5±1.8	0	0
11	8.58±1.2	9.88±1.9	29.1±2.6	39.1±2.3	7.45±2.6	7.90±2.8	18.3±14	10.8±4.3	2.75±2.9	2±2.1	71.25±15	85.17±4	7.25±3.5	2±0.8	0.12±0.3	0
12	9.05±1	98.35±1.4	30.6±1.3	38.3±1.8	6.76±2.2	9.02±3.3	16.3±8.4	20.5±12	3.3±2.5	4.3±3.6	70.5±8.2	72.6±15	9.75±1.6	2.5±1.3	0	0
13	9.94±1.5	10.47±2	32±1.7	38.3±1.2	7.41±2.7	9.17±3	27±8.2	18.8±10	5.25±3.2	5±4.1	59.6±9.6	70.8±16	8.1±4.6	3.6±0.8	0	0
14	6.42±5.3	10.17±1.2	31.8±2.2	39±1.8	6.70±2.2	9.62±3.2	21.63±11.6	18.6±5.6	2.1±1.8	3.5±2	73.88±11	73.6±4	2.6±1.1	3.8±0.7	0	0
15	9.32±9.1		30.8±2.9		6.13±2.2		17.8±8.3		2.6±2		66.8±8.9		12.5±3.6		0	

**Anexo 18.** Parámetros hematológicos en el grupo de ovinos en tratamiento infectados con *F. hepatica* a diferentes intervalos de tiempo y tratados con TCBZ.

Muestras PI	Eritrocitos (x10 <sup>6</sup> /ul)	Hematocrito (%)	Leucocitos (x10 <sup>3</sup> /ul)	Neutrófilos (%)	Eosinófilos (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Basófilos (%)
N°	Tratam							
1	9.6±1.8	39.8±4.4	9.4±3.4	5.1±2.1	1.5±1.0	92.2±3.6	2.1±1.3	0±0
2	10.47±1.54	35.8±3.9	7.43±3.2	5.25±2.4	1.5±2.1	91.5±5.4	2±1.5	0.12±0.3
3	8.03±1.08	31.6±2.3	7.14±4.2	12.25±9.9	4.3±5.2	79±1.1	4.3±2	0
4	7.75±1.5	28.9±1.3	6.55±3.3	6.25±8.2	5.1±3.3	85±9.1	3.6±2.7	0
5	8.57±1.2	30.81±3.9	6.06±2.5	14.25±8.6	4.75±2.7	79.8±9.0	1.6±1	0
6	9.74±1.2	30.5±1.7	5.31±1.9	20.3±7.5	6.6±3.2	68.3±1.1	4.6±3.2	0
7	8.95±1.4	27.8±1.6	6.58±3	20±9.1	8.8±5.5	71.1±10.1	6.75±2	0
8	7.67±8.4	27±1.4	5.64±2.2	21.13±11	7.3±6.3	67.3±15	4.13±2	0
9	8.71±1.1	30.4±2.6	7.10±2.7	17.1±9.2	3.87±4	67.25±6.3	11.7±4.4	0
10	7.05±2	27.5±2.2	8.15±3.2	28±14	6.6±3.8	59.6±17	5.7±2.2	0
11	8.58±1.2	29.1±2.6	7.45±2.6	18.3±14	2.75±2.9	71.25±15	7.25±3.5	0.12±0.3
12	9.05±1	30.6±1.3	6.76±2.2	16.3±8.4	3.3±2.5	70.5±8.2	9.75±1.6	0
13	9.94±1.5	32±1.7	7.41±2.7	27±8.2	5.25±3.2	59.6±9.6	8.1±4.6	0
14	6.42±5.3	31.8±2.2	6.70±2.2	21.63±11.6	2.1±1.8	73.88±11	2.6±1.1	0
15	9.32±9.1	30.8±2.9	6.13±2.2	17.8±8.3	2.6±2	66.8±8.9	12.5±3.6	0

**Anexo 19.** Parámetros hematológicos en el grupo de ovinos controles a diferentes intervalos de tiempo.

Muestras PI	Eritrocitos (x10 <sup>6</sup> /ul)	Hematocrito (%)	Leucocitos (x10 <sup>3</sup> /ul)	Neutrófilos (%)	Eosinófilos (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Basófilos (%)
N°	Control							
1	9.88±2.3	33.1±2.9	8.23±3	19±9.4	1.8±2.4	73.3±12	5.8±2.9	0
2	10.03±2.6	39.25±3	7.46±2.8	20.8±11	1.8±2.4	72.6±12	7±4.6	0
3	10.37±2.5	39.4±3	7.48±1.3	14.1±10	1.5±2.3	81.8±13.6	2.5±1.8	0
4	11.20±3.1	40±4.1	7.75±1.1	11.6±8.7	2.6±3.6	80.1±11.1	4±4.1	0
5	9.26±4.6	9.8±3.3	7.88±1.3	3.3±3.8	0	92.3±6	4.3±2.8	0
6	11.51±2.3	40.08±3.4	7.97±2.7	12.6±6	2.8±2	80.6±8.9	3.8±2.4	0
7	11.0±3	40.5±3.9	8.05±2.7	18.3±13	3.3±4.8	74.8±16	4±2.5	0
8	11.27±2.9	40.6±4.1	8.03±1.8	14.1±5.5	0	81.6±7	4.1±3	0
9	10.87±3.2	40.5±4.3	8.41±1.3	12.5±4.9	0	83.3±4.4	4.1±3	0
10	11.68±2.1	40±3.1	9.73±3.6	12.8±7.5	2±2.1	82.6±9.8	2.5±1.8	0
11	9.88±1.9	39.1±2.3	7.90±2.8	10.8±4.3	2±2.1	85.17±4	2±0.8	0
12	98.35±1.4	38.3±1.8	9.02±3.3	20.5±12	4.3±3.6	72.6±15	2.5±1.3	0
13	10.47±2	38.3±1.2	9.17±3	18.8±10	5±4.1	70.8±16	3.6±0.8	0
14	10.17±1.2	39±1.8	9.62±3.2	18.6±5.6	3.5±2	73.6±4	3.8±0.7	0
15								

**Anexo 20.** Subpoblaciones linfocitarias CD4 y CD8 y citoquinas IL4 e INF $\gamma$  en ovinos grupo control y ovinos en tratamiento según intervalos de tiempo.

Muestras PI		CD4 (%I)		CD8 (%)		IL4 (x10 <sup>3</sup> /ul)		INF $\gamma$ (%)	
N°	Fecha	G. tratamiento	control	G. tratamiento	control	G. tratamiento	control	G. tratamiento	control
1	4 jun /1 jun		42.5±17.4		29.8±12.4				
2	24jun / 21 jun		33.33±23.4		26±18.06				
3	5 ago/ 3 ago	36.75±14.8	49.83±17.1	41.75±9.19	32±10.86	15.12±7.1	13.16±3.4	39±15.5	55.5±5.24
4	27 ago/29 ago	51.25±10.2	40.16±20.02	35.5±11.89	37.66±6.8	25.87±6.17	10.66±3.2	37.8±7.2	59±2.52
5	18 set/7 set	56±8.14	39.16±7.3	26.12±6.8	53.33±10.32		11.83±6.04		56.33±5.8
6	9 oct/2 oct	39.8±11.89	6.66±16.32	33.87±7.2	7±17.14				
7	19 oct/18 oct	37.5±14.8	40±13.74	33.62±10.6	34.5±7.86				
8	11 nov/17 nov	45.25±12.2	45.33±7.71	22.75±7.2	36.33±7.31	32±3.5	11.5±4.1	14.25	57.83±2.99
9	2 dic/1 dic	28.12±5.6	45.33±7.71	39.12±8.1	36.33±7.31	32.12±5.8	23.5±5.2	14.12±4.8	58.16±8.37

10	12dic/10 dic	33.37±9.03	53.33±10.46	26.25±10.1	29.33±8.28				
11	30 dic/26 dic	33.3±10.95	38.83±9.1	35.87±14.63	46.33±8.5	38.75±5.2	11.83±3.5	12.62±5.7	55.83±5.34
12	20 ene/10 ene	39.5±15.7	32.5±12.14	31±11.3	37.16±19.82	45.37±7.2	9±5.29	11.37±4.9	54±5.65
13	1 feb/3 feb	35.62±8.2	32.5±12.1	24±5.4	37.16±19.8		10.66±5.2		54.33±5.71
14	23 feb/15 feb	56.25±9.1	41.83±5.4	17.6±8.2	35.16±7.3		13±6.05		49±5.75
15	2 mar/	37.37±7.6		28±11.01					

**Anexo 21.** Recuento promedio de *F. hepatica* (hpg) de ovinos infectados tratados con TCBZ y de ovinos controles no infectados durante los períodos pre, post infección y tratamiento.

N° Animales		Muestras pre infección y post tratamiento																	
	GC	Grupo Tratamiento																	
		1 4/6	2 24/6	3 5/8	4 28/8	5 18/9	6 9/10	7 12/10	8 19/10	9 11/11	12 2/12	11- T1 21/12	12 T2 30/12	13 T3 13/1	14 T4 20/1	15 T51/2	16 T623/2	17 T72/3	18 16/3
1	0	0	0	0	1	10	1	4	6	18	10	1	3	10	15	5	43	0	0
2	0	0	0	46	132	115	236	306	254	254	256	120	162	121	107	97	100	112	125
3	0	0	0	0	1	8	1	3	4	60	69	0	9	3	7	0	0	0	0
4	0	0	0	21	18	10	21	103	201	131	141	32	113	103	117	125	126	124	97
5	0	0	0	3	6	2	15	11	11	119	130	45	117	200	191	95	12	2	46
6	0	0	0	32	28	27	44	54	20	78	90	65	86	80	67	77	42	69	80
7	0	0	0	1	2	12	3	8	1	78	88	58	77	81	89	3	4	0	8
8	0	0	0	39	70	78	112	146	176	196	199	140	154	134	129	174	110	129	64
X	0	0	0	17.75	32.25	32.75	54.13	79.38	84.13	116.75	122.88	57.63	90.13	91.5	90.25	72	54.63	54.5	52.5
% Red											983	461 53.10	721 26.65	732 25.53	722 26.55	576 41.40	437 55.54	436 55.64	420 57.27

**Anexo 22. Protocolo de Inmunohistoquímica de Frotis Sanguíneo:** Se empleó el protocolo adaptado de Zafra et al., 2013.

**Reactivos para el Aislamiento de Leucocitos**

Tampón de Electrolisis Casero: Agua destilada, Cloruro de Amonio.

Bicarbonato Potásico y EDTA.

Procedimiento:

1. Añadir 2ml de tampón por cada 200 microlitros de sangre.
2. Vortex justo después de añadir el tampón, mezclar bien.
3. Incubar a temperatura ambiente, protegido de la luz, durante 15 minutos\*.
4. Centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.
5. Con cuidado aspirar el sobrenadante sin alterar el pellet que se haya formado.
6. Añadir 2ml de PBS y 1% FBS (suero fetal bovino).
7. Centrifugar otra vez a 1500 rpm durante 5 minutos.
8. Con cuidado aspirar el sobrenadante sin alterar el pellet que se haya formado.
9. Resuspender el pellet en 0'5 ml de PBS-FBS.

**Inmunocitoquímica de Frotis**

Día 1

1. Sacar láminas del congelador y fijación (acetona) 10'. Antes del siguiente paso dejar que se sequen los portaobjetos.
2. Eliminar la Peroxidasa endógena para desenmascarar a los Ag.
3. PBS 2L 10'. Se hace por inmersión en una cuneta. Realizar todos los lavados de la misma manera.
4. SNCa (Suero normal de cabra) 10% 30'.
5. Añadir el anticuerpo primario. Dejarlo un día en nevera.

DÍA 2

6. 3 lavados en PBS 5'.
7. Ac. Secundario 45' a 37°C (estufa).
  - Monoclonales 1:50 (anti-rabbit).
  - Policlonales 1:200 (anti-rabbit).
8. 3 baños PBS 5'.
9. Kit ABC 1h (Tª ambiente y oscuridad).
10. 3 Lavados PBS 5'.
11. Revelar con NOVARED (2-7').
12. Lavar en agua 5'. Con el grifo corrido
13. Teñir con H-E. La hematoxilina diluida 1:10 en agua destilada (5').
14. Lavar con agua.
15. Montar con Eukitt. Para ello antes secar en estufa y luego lo sumergir dos veces en alcohol 100° durante 1' cada uno, xilol dos pases 1' cada uno. Montar las láminas con los cubreobjetos.

### **Anexo 23. Diagnóstico de *F. hepatica***

#### **Método de Sedimentación (Urquhart et al., 2001) modificado.**

Homogenizar 3 g de heces con agua y pasar la suspensión a través de un tamiz grueso (poro de 250 µm). Lavar el material retenido en el tamiz usando un fino chorro de agua y descartar los restos.

Depositar el filtrado en un vaso cónico y dejar en reposo durante 5 minutos.

Después de 3 lavados consecutivos, eliminar el sobrenadante y pasar el resto (aproximadamente 5- 10 ml) a una placa de Petri marcada con un interlineado de 1 cm.

Se añaden 3 gotas de azul de metileno al 5%, examinando el sedimento en estereoscopio microscopio a 40x. Los huevos de trematodos son visibles de color amarillo brillante sobre el fondo azul pálido.

### **Anexo 24. Protocolo experimental de producción de metacercarias de *F. hepatica* *in vitro*:**

#### **Crianza e infección de caracoles *Lymnaea viatrix*.**

600 caracoles fueron obtenidos de masas de huevos mantenidas en condiciones de laboratorio provenientes de caracoles recolectados de acequias. Los caracoles recién nacidos fueron criados en contenedores de vidrio. Con un tamaño aproximado de 3-4 mm fueron individualmente infectados con miracidios de *F. hepatica* (3 a 5 miracidios por caracol mantenidos durante 12 horas en placas de ELISA de 90 pozos). Luego fueron transferidos y criados en contenedores plásticos de 4 litros de capacidad, herméticamente cerrados, mantenidos en una temperatura que fluctuó entre los 12 a 24 grados y expuestos a una fase de luz diaria ambiental.

Los caracoles fueron alimentados con lechuga secada, esterilizada al microondas y triturada en mortero, germinado de alfalfa verde y suplementados con una formulación de calcio para tortugas. Asimismo, se aseguró la oxigenación permanente del agua con una bomba oxigenadora de pecera.

**Obtención de las metacercarias.** A partir del día 45 post infección, los caracoles empezaron a eliminar metacercarias. Para estimular la emergencia y enquistamiento de la cercaria en un tiempo uniforme de los caracoles, éstos se separaron en grupos de 10 caracoles en bolsas de polietileno con agua y se indujo la producción de cercarias a través de cambios bruscos de temperaturas del agua y de luz, con agua a 4 °C y cambios de completa oscuridad (caja oscura) a exposición de luz (de estereoscopio) respectivamente. Las metacercarias adheridas al plástico fueron colectadas, contadas, conservadas en frascos estériles con agua y en refrigeración a 4° hasta su posterior uso.

## Anexo 25: Estadísticos descriptivos.

		Estadístico	Error estándar	
HtoControl	Media	39.6371	.20156	
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	39.2017	
		Límite superior	40.0726	
	Media recortada al 5%	39.6524		
	Mediana	39.6250		
	Varianza	.569		
	Desviación estándar	.75418		
	Mínimo	38.33		
	Máximo	40.67		
	Rango	2.34		
	Rango intercuartil	1.14		
	Asimetría	-.416	.597	
	Curtosis	-.661	1.154	
	HtoTratamiento	Media	31.0064	.91145
95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior	29.0374	
		Límite superior	32.9755	
Media recortada al 5%		30.7394		
Mediana		30.5950		
Varianza		11.630		
Desviación estándar		3.41032		
Mínimo		26.94		
Máximo		39.88		
Rango		12.94		
Rango intercuartil		3.18		
Asimetría		1.497	.597	
Curtosis		2.770	1.154	
EritrocitosContrl		Media	10,655,191.0000	170,828.73330
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	10,286,137.9590	
		Límite superior	11,024,244.0410	
	Media recortada al 5%	10,643,315.7778		
	Mediana	10,676,375.0000		
	Varianza	408554385690.769		
	Desviación estándar	639,182.59182		
	Mínimo	9.84E+06		
	Máximo	1.17E+07		
	Rango	1,852,530.00		
	Rango intercuartil	1,220,917.00		
	Asimetría	.128	.597	
	Curtosis	-1.427	1.154	

EritrocitosTratamiento	Media		8,750,530.9286	251,914.42290
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	8,206,302.9052	
		Límite superior	9,294,758.9519	
	Media recortada al 5%		8,749,020.4762	
	Mediana		8,652,125.0000	
	Varianza		888452270526.687	
	Desviación estándar		942,577.46129	
	Mínimo		7.05E+06	
	Máximo		1.05E+07	
	Rango		3,421,750.00	
	Rango intercuartil		1,504,718.75	
	Asimetría		.062	.597
	Curtosis		-.290	1.154
	LeucocitosControl	Media		8,340.0000
95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior	7,906.5387	
		Límite superior	8,773.4613	
Media recortada al 5%			8,311.3889	
Mediana			8,046.5000	
Varianza			563602.462	
Desviación estándar			750.73461	
Mínimo			7,462.00	
Máximo			9,733.00	
Rango			2,271.00	
Rango intercuartil			1,209.75	
Asimetría			.837	.597
Curtosis			-.545	1.154
LeucocitosTratamiento		Media		6,984.9286
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	6,385.4875	
		Límite superior	7,584.3696	
	Media recortada al 5%		6,940.3651	
	Mediana		6,934.5000	
	Varianza		1077867.302	
	Desviación estándar		1,038.20388	
	Mínimo		5,319.00	
	Máximo		9,453.00	
	Rango		4,134.00	
	Rango intercuartil		1,012.75	
	Asimetría		.715	.597
	Curtosis		1.515	1.154
	Neutrófilos control	Media		15.0000
95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior	12.1714	
		Límite superior	17.8286	

	Media recortada al 5%		15.3333	
	Mediana		14.0000	
	Varianza		24.000	
	Desviación estándar		4.89898	
	Mínimo		3.00	
	Máximo		21.00	
	Rango		18.00	
	Rango intercuartil		6.25	
	Asimetría		-.911	.597
	Curtosis		1.378	1.154
Neutrofilos Tratamiento	Media		16.5000	1.99105
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	12.1986	
		Límite superior	20.8014	
	Media recortada al 5%		16.5000	
	Mediana		17.5000	
	Varianza		55.500	
	Desviación estándar		7.44983	
	Mínimo		5.00	
	Máximo		28.00	
	Rango		23.00	
	Rango intercuartil		10.75	
	Asimetría		-.278	.597
	Curtosis		-.708	1.154
Eosinofilos Control	Media		2.2014	.41487
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	1.3052	
		Límite superior	3.0977	
	Media recortada al 5%		2.1683	
	Mediana		2.0000	
	Varianza		2.410	
	Desviación estándar		1.55230	
	Mínimo		0.00	
	Máximo		5.00	
	Rango		5.00	
	Rango intercuartil		2.25	
	Asimetría		.074	.597
	Curtosis		-.526	1.154
Eosinofilos Tratamiento	Media		4.4486	.62763
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	3.0927	
		Límite superior	5.8045	
	Media recortada al 5%		4.3662	
	Mediana		4.5650	
	Varianza		5.515	
	Desviación estándar		2.34837	

	Mínimo		1.50	
	Máximo		8.88	
	Rango		7.38	
	Rango intercuartil		4.53	
	Asimetría		.341	.597
	Curtosis		-.901	1.154
LinfocitosControl	Media		78.9879	1.64430
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	75.4356	
		Límite superior	82.5402	
	Media recortada al 5%		78.6998	
	Mediana		80.4150	
	Varianza		37.852	
	Desviación estándar		6.15242	
	Mínimo		70.83	
	Máximo		92.33	
	Rango		21.50	
	Rango intercuartil		9.67	
	Asimetría		.517	.597
	Curtosis		-.121	1.154
LinfocitosTratamiento	Media		74.0436	2.75369
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	68.0946	
		Límite superior	79.9925	
	Media recortada al 5%		73.8356	
	Mediana		71.1900	
	Varianza		106.159	
	Desviación estándar		10.30335	
	Mínimo		59.63	
	Máximo		92.20	
	Rango		32.57	
	Rango intercuartil		13.81	
	Asimetría		.498	.597
	Curtosis		-.481	1.154

## Correlación de las muestras.

Correlaciones de muestras emparejadas				
		N	Correlación	Sig.
Par 1	HtoControl & HtoTratamiento	14	-.491	.075
Par 2	EritrocitosContrl & EritrocitosTratamiento	14	-.470	.090
Par 3	LeucocitosControl & LeucocitosTratamiento	14	.227	.435
Par 4	Neutrofiloscontrol & NeutrofilosTRatamiento	14	-.040	.892
Par 5	EosinofilosControl & EosinofilosTratamiento	14	.086	.771
Par 6	LInfocitosControl & LinfocitosTratamiento	14	-.100	.733

## Prueba de normalidad de nuestras

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
HtoControl	.125	14	.200*	.932	14	.328
HtoTratamiento	.243	14	.025	.863	14	.034
EritrocitosContrl	.135	14	.200*	.925	14	.261
EritrocitosTratamiento	.135	14	.200*	.985	14	.994
LeucocitosControl	.219	14	.067	.881	14	.060
LeucocitosTratamiento	.182	14	.200*	.951	14	.571
Neutrofiloscontrol	.158	14	.200*	.892	14	.086
NeutrofilosTRatamiento	.135	14	.200*	.936	14	.374
EosinofilosControl	.136	14	.200*	.944	14	.470
EosinofilosTratamiento	.124	14	.200*	.943	14	.452
LInfocitosControl	.179	14	.200*	.919	14	.212
LinfocitosTratamiento	.178	14	.200*	.932	14	.324

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

## T student

Estadística de muestras emparejadas.

		Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar
Par 1	HtoControl	39.6371	14	.75418	.20156
	HtoTratamiento	31.0064	14	3.41032	.91145
Par 2	EritrocitosContrl	10,655,191.0000	14	639,182.59182	170,828.73330
	EritrocitosTratamiento	8,750,530.9286	14	942,577.46129	251,914.42290
Par 3	LeucocitosControl	8,340.0000	14	750.73461	200.64227
	LeucocitosTratamiento	6,984.9286	14	1,038.20388	277.47166
Par 4	Neutrofiloscontrol	15.0000	14	4.89898	1.30931
	NeutrofilosTRatamiento	16.5000	14	7.44983	1.99105
Par 5	EosinofilosControl	2.2014	14	1.55230	.41487
	EosinofilosTratamiento	4.4486	14	2.34837	.62763
Par 6	LInfocitosControl	78.9879	14	6.15242	1.64430
	LinfocitosTratamiento	74.0436	14	10.30335	2.75369

Correlaciones.

Correlaciones de muestras emparejadas				
		N	Correlación	Sig.
Par 1	HtoControl & HtoTratamiento	14	-.491	.075
Par 2	EritrocitosContrl & EritrocitosTratamiento	14	-.470	.090
Par 3	LeucocitosControl & LeucocitosTratamiento	14	.227	.435
Par 4	Neutrofiloscontrol & NeutrofilosTRatamiento	14	-.040	.892
Par 5	EosinofilosControl & EosinofilosTratamiento	14	.086	.771
Par 6	LInfocitosControl & LinfocitosTratamiento	14	-.100	.733

Prueba T.

		Prueba de muestras emparejadas					t	gl	Sig. (bilate ral)
		Diferencias emparejadas							
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	HtoControl – HtoTratamiento	8.63071	3.83717	1.02553	6.41520	10.84623	8.416	13	.000
Par 2	EritrocitosContrl – EritrocitosTratamiento	1,904,660.07143	1,365,219.69559	364,870.31133	1,116,405.68716	2,692,914.45569	5.220	13	.000
Par 3	LeucocitosControl – LeucocitosTratamiento	1,355.07143	1,134.70494	303.26265	699.91230	2,010.23056	4.468	13	.001
Par 4	Neutrofiloscontrol - NeutrofilosTRatamiento	-1.50000	9.07872	2.42639	-6.74189	3.74189	-618	13	.547
Par 5	EosinofilosControl – EosinofilosTratamiento	-2.24714	2.70190	.72211	-3.80717	-.68711	-	13	.008
Par 6	LinfocitosControl – LinfocitosTratamiento	4.94429	12.51813	3.34561	-2.28346	12.17204	1.478	13	.163

Estadísticos descriptivos CD4, CD8, IL4 y INF $\alpha$ .

Descriptivos				
		Estadístico	Error estándar	
CD4 Control	Media	33.9550	9.40780	
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	4.0152	
		Límite superior	63.8948	
	Media recortada al 5%	34.5889		
	Mediana	39.6600		
	Varianza	354.027		
	Desviación estándar	18.81560		
	Mínimo	6.67		
	Máximo	49.83		
	Rango	43.16		
	Rango intercuartil	32.62		
	Asimetría	-1.595	1.014	
	Curtosis	2.988	2.619	
	CD4 Tratamiento	Media	45.9700	4.56961
95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior	31.4275	
		Límite superior	60.5125	
Media recortada al 5%		45.9250		
Mediana		45.5650		
Varianza		83.525		
Desviación estándar		9.13922		
Mínimo		36.75		
Máximo		56.00		
Rango		19.25		
Rango intercuartil		17.28		
Asimetría		.128	1.014	
Curtosis		-4.183	2.619	
CD8 Control		Media	32.5000	9.62253
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	1.8768	
		Límite superior	63.1232	
	Media recortada al 5%	32.7594		
	Mediana	34.8350		
	Varianza	370.373		
	Desviación estándar	19.24507		
	Mínimo	7.00		
	Máximo	53.33		
	Rango	46.33		
	Rango intercuartil	36.17		
	Asimetría	-.693	1.014	
	Curtosis	1.367	2.619	
	CD8 Tratamiento	Media	34.3150	3.21282
95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior	24.0904	
		Límite superior	44.5396	

	Media recortada al 5%		34.3567
	Mediana		34.6900
	Varianza		41.289
	Desviación estándar		6.42565
	Mínimo		26.13
	Máximo		41.75
	Rango		15.62
	Rango intercuartil		12.12
	Asimetría	-0.341	1.014
	Curtosis	1.255	2.619
IL4 Control	Media		14.6650 2.94603
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	5.2894
		Límite superior	24.0406
	Media recortada al 5%		14.3500
	Mediana		11.8300
	Varianza		34.716
	Desviación estándar		5.89205
	Mínimo		11.50
	Máximo		23.50
	Rango		12.00
	Rango intercuartil		9.00
	Asimetría	1.996	1.014
	Curtosis	3.986	2.619
IL4 Tratamiento	Media		37.0650 3.18835
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	26.9182
		Límite superior	47.2118
	Media recortada al 5%		36.8844
	Mediana		35.4400
	Varianza		40.662
	Desviación estándar		6.37670
	Mínimo		32.00
	Máximo		45.38
	Rango		13.38
	Rango intercuartil		11.69
	Asimetría	.847	1.014
	Curtosis	-1.324	2.619
INF $\alpha$ Control	Media		57.0400 .56783
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	55.2329
		Límite superior	58.8471
	Media recortada al 5%		57.0444
	Mediana		57.0800
	Varianza		1.290
	Desviación estándar		1.13566
	Mínimo		55.83
	Máximo		58.17
	Rango		2.34

	Rango intercuartil		2.13
	Asimetría		-.088 1.014
	Curtosis		-4.647 2.619
INF $\alpha$ Tratamiento	Media		13.0975 .68085
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	10.9307
		Límite superior	15.2643
	Media recortada al 5%		13.1289
	Mediana		13.3800
	Varianza		1.854
	Desviación estándar		1.36170
	Mínimo		11.38
	Máximo		14.25
	Rango		2.87
	Rango intercuartil		2.53
	Asimetría		-.670 1.014
	Curtosis		-2.205 2.619

Prueba de normalidad de nuestras CD4, CD8, IL4 y INF $\alpha$ .

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
CD4 Control	.359	4		.838	4	.189
CD4 Tratamiento	.247	4		.912	4	.496
CD8 Control	.240	4		.967	4	.825
CD8 Tratamiento	.223	4		.978	4	.888
IL4 Control	.435	4		.653	4	.003
IL4 Tratamiento	.281	4		.869	4	.294
INF $\alpha$ Control	.257	4		.892	4	.392
INF $\alpha$ Tratamiento	.276	4		.888	4	.372

*Fuente:*

## T student

Estadística de muestras emparejadas CD4, CD8, IL4 y INF $\alpha$ ..

Estadísticas de muestras emparejadas					
		Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar
Par 1	CD4 Control	38.7892	12	11.84130	3.41829
	CD4 Tratamiento	41.0750	12	9.17031	2.64724
Par 2	CD8 Control	35.5967	12	10.99822	3.17491
	CD8 Tratamiento	30.6275	12	7.26992	2.09864
Par 3	IL4 Control	13.7500	6	4.84398	1.97755
	IL4 Tratamiento	31.5450	6	10.44426	4.26385
Par 4	INF $\alpha$ Control	57.1100	6	1.41796	.57888
	INF $\alpha$ Tratamiento	21.5450	6	13.13402	5.36194

## Correlaciones.

Correlaciones de muestras emparejadas				
		N	Correlación	Sig.
Par 1	CD4 Control & CD4 Tratamiento	12	-.062	.849
Par 2	CD8 Control & CD8 Tratamiento	12	-.215	.503
Par 3	IL4 Control & IL4 Tratamiento	6	.271	.604
Par 4	INF $\alpha$ Control & INF $\alpha$ Tratamiento	6	.072	.893

## Prueba T.

Prueba de muestras emparejadas									
		Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	CD4 Control - CD4 Tratamiento	-2.28583	15.41663	4.45040	-12.08109	7.50943	-.514	1	.618
Par 2	CD8 Control - CD8 Tratamiento	4.96917	14.42684	4.16467	-4.19721	14.13554	1.193	1	.258
Par 3	IL4 Control - IL4 Tratamiento	-17.79500	10.25480	4.18650	-28.55675	-7.03325	-4.251	5	.008
Par 4	INF $\alpha$ Control - INF $\alpha$ Tratamiento	35.56500	13.10877	5.35163	21.80819	49.32181	6.646	5	.001

## Estadísticos descriptivos Monocitos y Basófilos.

Descriptivos <sup>a</sup>				
		Estadístico	Error estándar	
Monocitos Control	Media	2.3907	.32359	
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	1.6916	
		Límite superior	3.0898	
	Media recortada al 5%	2.3541		
	Mediana	2.5050		
	Varianza	1,466		
	Desviación estándar	1.21076		
	Mínimo	.75		
	Máximo	4.69		
	Rango	3.94		
	Rango intercuartil	1.80		
	Asimetría	.305	.597	
	Curtosis	-.490	1,154	
Monocitos Tratamiento	Media	2.4329	.30992	
	Límite inferior	1.7633		

	95% de intervalo de confianza para la media	Límite superior	3.1024	
	Media recortada al 5%		2.3848	
	Mediana		2.1500	
	Varianza		1,345	
	Desviación estándar		1.15961	
	Mínimo		1.06	
	Máximo		4.67	
	Rango		3.61	
	Rango intercuartil		1.88	
	Asimetría		,808	,597
	Curtosis		-,360	1,154
Basófilos Tratamiento	Media		.0186	.01262
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	-.0087	
		Límite superior	.0458	
	Media recortada al 5%		.0134	
	Mediana		.0000	
	Varianza		,002	
	Desviación estándar		.04721	
	Mínimo		.00	
	Máximo		.13	
	Rango		.13	
	Rango intercuartil		.00	
	Asimetría		2,295	,597
	Curtosis		3,792	1,154

a. Basófilos Control es constante. Se ha omitido.

Prueba de normalidad de muestras Monocitos y Basófilos.

	<b>Pruebas de normalidad<sup>c</sup></b>					
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Monocitos Control	,147	14	,200*	,944	14	,466
Monocitos Tratamiento	,206	14	,112	,909	14	,152
Basófilos Tratamiento	,510	14	,000	,428	14	,000

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

c. Basófilos Control es constante. Se ha omitido.

## T student

Estadísticas de muestras emparejadas Monocitos y Basófilos.

Estadísticas de muestras emparejadas					
		Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar
Par 1	Monocitos Control	2.3907	14	1.21076	.32359
	Monocitos Tratamiento	2.4329	14	1.15961	.30992
Par 2	Basófilos Control	.0000	14	.00000	.00000
	Basófilos Tratamiento	.0186	14	.04721	.01262

Correlaciones.

Correlaciones de muestras emparejadas				
		N	Correlación	Sig.
Par 1	Monocitos Control & Monocitos Tratamiento	14	-,200	,493
Par 2	Basófilos Control & Basófilos Tratamiento	14	.	.

Prueba T.

Prueba de muestras emparejadas									
		Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	Monocitos Control - Monocitos Tratamiento	-.04214	1.83648	.49082	-1.10250	1.01821	-.086	13	,933
Par 2	Basófilos Control - Basófilos Tratamiento	-.01857	.04721	.01262	-.04583	.00869	-1,472	13	,165

Anexo 26.



Foto 1. Recolección de caracoles *Lymnaea* spp.



Foto 2. Crianza y producción de caracoles *Lymnaea* a partir de masas de huevos, 10x.



Foto 3. Infección de caracoles de 3–4 mm con miracidios de *F. hepática*.



Foto 4. Crianza controlada durante 12 a 14 semanas.



Foto 5. Alimentación de caracoles: Lechuga deshidratada y molida.



Foto 6. Alimentación de caracoles: Brotes de alfalfa.



Foto 7. Cercarias emergiendo de caracol.

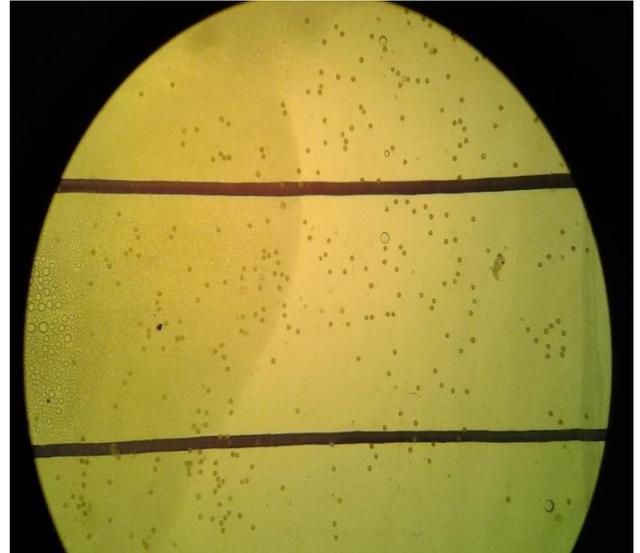


Foto 8. Enquistamiento en bolsas de polietileno.



Foto 9. 08 ovinos del grupo en tratamiento.



Foto 10. Alimentación con heno de alfalfa, maralfalfa y concentrado.

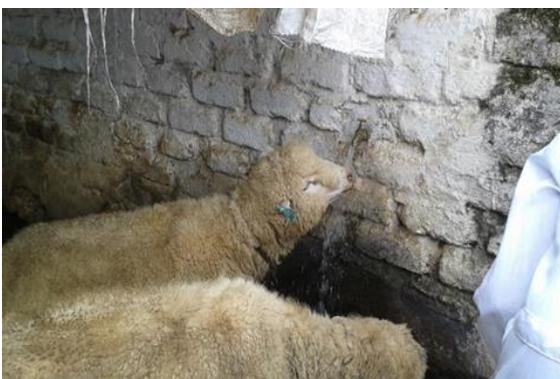


Foto 11. Suministro de Agua.



Foto 12. Suministro de sal común y mineral.



Foto 13. Tratamientos antiparasitarios.



Foto 15. Muestras de heces para exámenes parasitológicos.



Foto 17. Huevos de *F. hepatica*. Tinción azul de metileno

Foto 14. Muestras de sangre para



hemogramas, inmunohistoquímica

Foto 16. Linfocitos. Tinción Romanowsky. 100x.

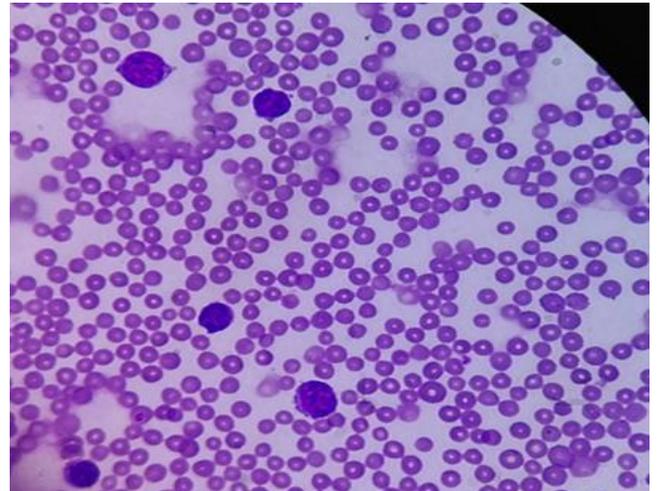


Foto 16. Linfocitos. Tinción Romanowsky. 100x.

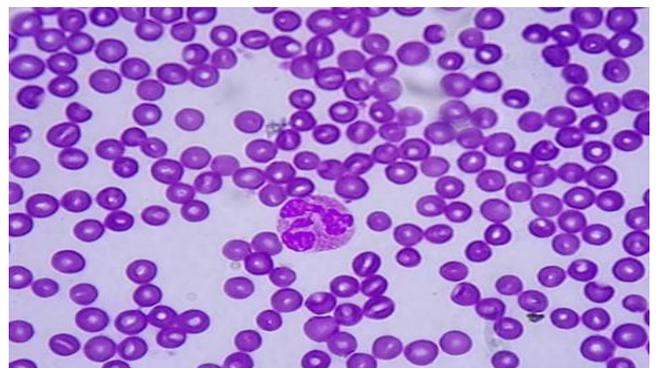


Foto 18. Eosinófilo Tinción Romanowsky. 100x



Foto 19. Control de anemia, método FAMACHA



Foto 20. Tratamiento antiparasitario con TCBZ



Foto 21. Procesamiento y lectura de muestras.



Foto 22. Anticuerpos monoclonales IL4, INF $\gamma$ , CD4, CD8.

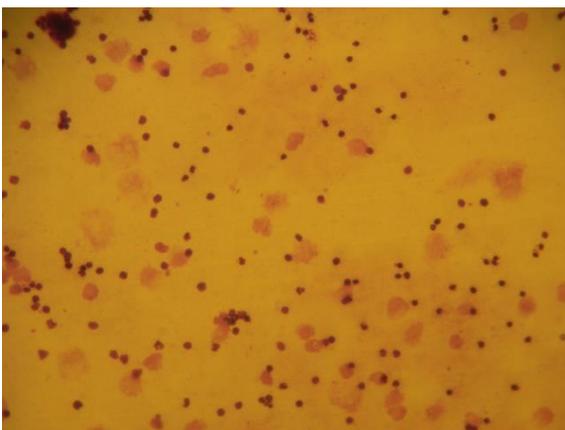


Foto 23. Aplicación de Protocolo de separación de linfocitos para inmunohistoquímica.

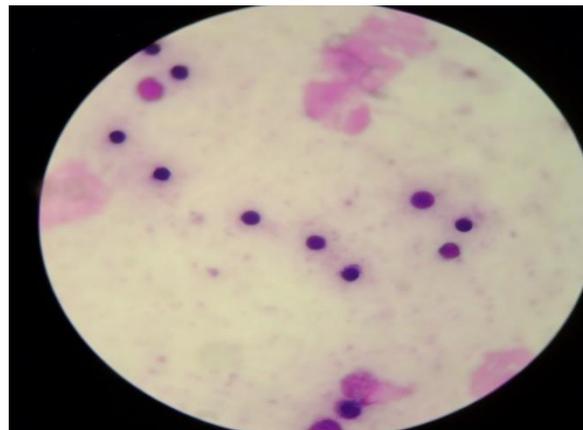


Foto 24. Verificación linfocitos obtenidos con tinción de Romanowsky

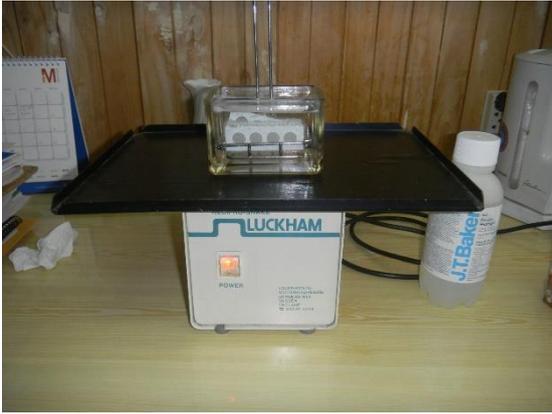


Foto 25. Fijado de linfocitos en láminas, con acetona.



Foto 26. Proceso de incubación con anticuerpos monoclonales.

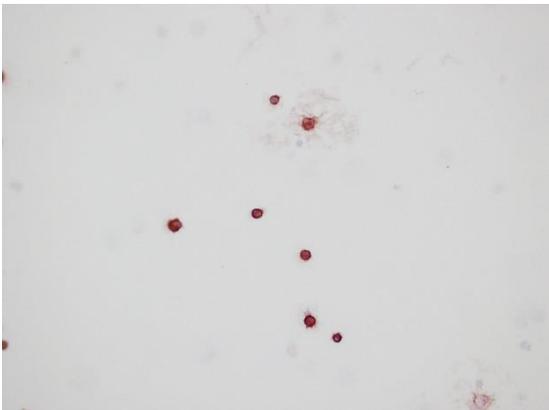


Foto 27. Control positivo. 100x.



Foto 28. Control Negativo. 100x.

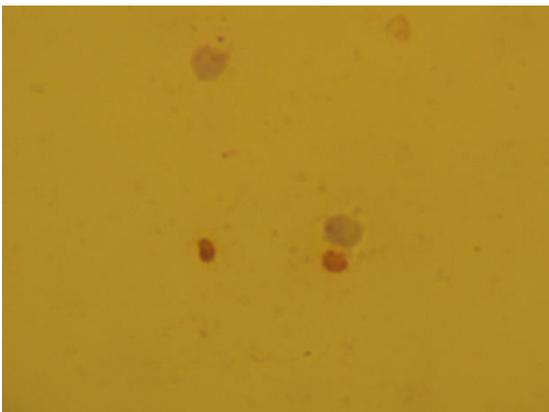


Foto 29. Linfocitos CD4, 100x.

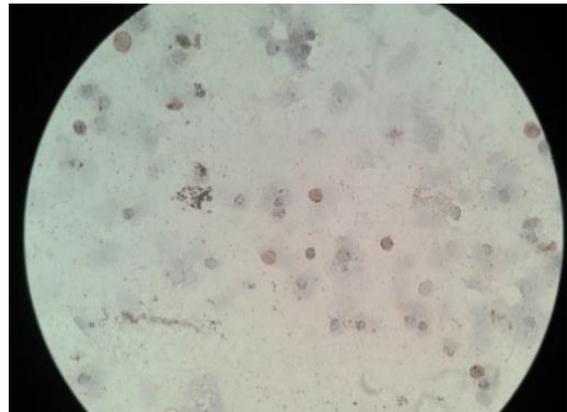


Foto 30. Linfocitos CD8. 100x.



Foto. 31. 06 ovinos del grupo control. Alimentación con heno de alfalfa y de rastrojos de cosechas de arroz, lenteja y concentrado.



Foto 32. Recolección de sangre y heces ovinos Grupo Control.



Foto 33. Muestras sangre y heces grupo control.



Foto 34. Preparación de heno de maralfalfa



Foto 35. Materiales de procesamiento de muestras para el método de sedimentación.



Foto 36. Recolección de datos ovinos grupo tratamiento.