



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA FASCIOLICIDA *in vitro* DE 14
EXTRACTOS DE PLANTAS MEXICANAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

CRISTINA KARLA SÁNCHEZ PERALTA



ASESORES:

DR. FROYLÁN IBARRA VELARDE

DRA. YOLANDA VERA MONTENEGRO

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores: Dr. Froylán Ibarra Velarde y Dra. Yolanda Vera Montenegro, por su apoyo, tiempo, comprensión, paciencia. Gracias a ambos por su amistad.

A los honorables miembros de mi jurado: Dr. Héctor Quiroz Romero, Dra. Irene Cruz Mendoza, Dr. David Paez Esquiliano y Dra. Enedina Silva Cabrera, por compartir conmigo su sabiduría, la inquietud de conocer cada día más y sobre todo por haber realizado una revisión crítica y darme las pertinentes recomendaciones para reforzar el presente trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Parasitología por abrirme las puertas y permitirme realizar mis estudios.

Al Laboratorio de Fitoquímica FES Iztacala, UNAM y al Laboratorio de Fitoquímica UAM-Xochimilco, por proporcionar los extractos de plantas.

A José Manuel Álvarez, gracias por tu valioso tiempo, apoyo y por enseñarme a realizar el paso de la muerte, desenquistar artificialmente *Fasciola hepatica*.

Al laboratorio Salud Animal, S.A de C.V. gracias por el financiamiento de la impresión de tesis.

DEDICATORIA

A mis padres Consuelo Peralta y Constantino Sánchez Sánchez, quienes siempre me han soportado mis berrinches y arrebatos; gracias por todos esos regaños y lecciones que al parecer no he comprendido bien pero siempre están ahí para recordármelas, pero sobre todo gracias por su apoyo, amor y sabiduría. Los amo viejitos hermosos.

A mi Manito (Alejandrooooo) Juan Alejandro Sánchez Peralta, mi compañero de guerra, en triunfos y derrotas, el que siempre tiene las palabras perfectas en el momento indicado, ya sea para hacerme sentir mas mal o mejor. Gracias por cuidarme, procurarme y por todo lo vivido. Te amo hermano.

Al Tequila †, Negro †, Thor †, Pulgas, Capulín, Chocolate, Nievécita, Dumbo, Kien, Maya (mis canhijos siempre fieles), a la bicha, a pichi y ahora también a mis chivos, Chucha y Pancho., que hacen mis días mas batallosos, pero también muy felices y que cuando no me encuentran en casa, se paran a la orilla de la puerta de mi cuarto esperando a que salga, con la ilusión de verme aun que sea unos segundos y escuchar un buenos días niñitos.

A Sonia Santos González por ser mi persona favorita, la que siempre escucha mis locuras, por tus consejos, por involucrarte tanto en mi vida y a tu Mamá Elena, por todo el apoyo en estos 20 años.

A mi Abuelita Leocadia, tía Masha, mis tíos: Felipe, Rosa, Mode, Coco, Joel †, Susa, Mario, Enrique, More y familia, por sus palabras de aliento para seguir adelante.

A mi tío Roy, el siempre me recuerda que quiere tener cerditos en el rancho y que quiere que yo sea la MVZ oficial, gracias por mi beca dominical, el apoyo incondicional y por los buenos consejos.

A Rodrigo de Gardenia, me da mucha alegría contar que eres mi primito, por todo lo que haces, por lo que has sembrado en mi, por que tal vez sin ti, sin tus platicas, sin tus consejos, mi vida no seria tan apasionada por la literatura, por que en la vida hay que tener sueños y hay que esforzarnos por alcanzarlos.

A mis primos Rosalba, Clau, Edgar, Alma, Azu, Miri, Adri, Feli, Ale, Gris, por los buenos momentos que eh pasado a su lado en este corto camino de mi vida.

A mi Ma, Dra, Alejandra Mercadillo y Dr. Mario Haro, los quiero mucho, gracias por su amistad, por sus consejos y apapachos.

A la Dra. Angélica, Dr. Cristian, Sra. Marina y al Joven, por dejarme ser parte de esta familia, eh estado en diferentes trabajos, pero sin duda este es el mejor lugar, donde puedo aprender de unos grandes lideres, donde el ambiente esta lleno de armonía y calidez. Gracias por invertir tiempo, esfuerzo y dedicación en mi crecimiento profesional.

A mis amigos durante estos años de Licenciatura: Avispa, Muñeco, Katia, Karina, Karen, Marian, Betsy. que buenos momentos vivimos, compartimos muchas cosas y como bien sabíamos al final de la carrera cada quien tomaría un rumbo distinto.

A Kareri Rosas mi pequeña amiga, la que al final siempre entiende mi vida, cual compleja es, que a pesar de todo, siempre esta ahí. Te quiero mil.

A mi familia Mazateca Bety, Lili, Mary, Mir, Yechua, que buenas aventuras, excelentes recuerdos y la mejor compañía. Y sobre todo a ti César... "Por que sin buscarte, te ando encontrando en todos lados, principalmente cuando cierro los ojos" Julio Cortázar.

Y por último pero no menos importante a Barut Abascal, gracias por los años que compartimos juntos durante la Licenciatura, fuiste mi gran motor, la persona con la que compartí todo, con una hermosa familia y aunque al final solo seamos amigos, sabes que siempre estaré apoyándote, nunca te rindas, da tu mejor esfuerzo, infinitas gracias de que me hayas presentado al Dr. Froylán.

"Quién lo diría, los débiles de veras nunca se rinden"

Mario Benedetti.

CONTENIDO

| | |
|----------------------------------------------------------------|----|
| 1. Cuadros y figuras | 6 |
| 2. Resumen | 7 |
| 3. Introducción | 8 |
| 4. Importancia Económica | 9 |
| 5. Morfología de <i>Fasciola hepatica</i> | 10 |
| 6. Ciclo evolutivo de <i>Fasciola hepatica</i> | 14 |
| 7. Patogenia y lesiones | 15 |
| 8. Signología | 16 |
| 9. Fasciolosis humana | 18 |
| 10. Diagnóstico | 18 |
| 11. Quimioterapia | 20 |
| 12. Etnobotánica | 20 |
| 13. Justificación | 25 |
| 14. Hipótesis | 26 |
| 15. Objetivos | 26 |
| 16. Material y métodos | 26 |
| 16.1. Localización del estudio. | 26 |
| 16.2. Obtención de extractos | 26 |
| 16.3. Procedimiento para la elaboración de extractos | 27 |
| 16.4. Evaluación fasciolicida <i>in vitro</i> de los extractos | 28 |
| 16.5. Interpretación de la Prueba | 30 |
| 16.6. Medición de la eficacia | 30 |
| 16.7. Análisis de datos | 30 |
| 17. Resultados | 31 |
| 18. Discusión | 38 |
| 19. Conclusión | 41 |
| 20. Referencias | 42 |

CUADROS Y FIGURAS

- Cuadro 1. Eficacia fasciolicida *in vitro* de extractos de plantas mexicanas a las 24 horas postexposición 31
-
- Cuadro 2. Eficacia fasciolicida *in vitro* de extractos de plantas mexicanas a las 48 horas postexposición 32
-
- Cuadro 3. Eficacia fasciolicida *in vitro* de extractos de plantas mexicanas a las 72 horas postexposición 33
-
- Figura 1. Porcentaje de Eficacia de los cuatro extractos que mostraron mayor actividad fasciolicida a las 24, 48 y 72 horas postexposición en una concentración de 500 mg/L.* 36
-
- Cuadro 4. Características de los 14 extractos de plantas mexicanas proporcionados por la FES-Iztacala 37

2. Resumen

El objetivo del presente estudio fue evaluar bajo condiciones *in vitro* la eficacia fasciolicida de 14 extractos hexánicos de plantas mexicanas. Para ello se utilizaron metacercarias de *Fasciola hepatica* obtenidas a partir de la infección de caracoles *Lymnaea humilis*. Estas fueron desenquistadas mediante un método de activación y emergencia, incubando los parásitos en medio RPMI-1640 con antibióticos a 39°C hasta su uso. Por otro lado se prepararon diluciones de los extractos en estudio a concentraciones de 500, 375, 250 y 125 mg/L. Posteriormente se utilizaron placas de cultivo estériles de 24 pozos marca NUNC® a los cuales se les añadió: 200 µL de extracto; 1.6 ml de medio RPMI-1640 y 0.2 ml conteniendo 10 adolescarias de *F. hepatica* por cada pozo. Cada placa fue incubada a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%. La eficacia fue medida con base a la mortalidad de adolescarias de *F. hepatica* con respecto al grupo testigo sin tratamiento. Las lecturas para la evaluación de la eficacia fueron realizadas a las 24, 48 y 72 horas posincubación, utilizando un microscopio invertido a 40x. Todas estas actividades fueron realizadas bajo condiciones de semisterilidad utilizando una campana de flujo laminar. Los resultados indicaron que de los 14 extractos evaluados bajo condiciones *In Vitro*, *Bocconia frutescens* (Gordolobo), mostró alta eficacia fasciolicida, causando mortalidad entre el 85 al 98% en las 24-72 horas post exposición, respectivamente y *Buddleja cordata* (tepozán) mostró eficacia moderada de 83.3% a las 72 horas post exposición. Se concluye que de los 14 extractos evaluados bajo condiciones *in Vitro*, *Bocconia frutescens* (Gordolobo), fue el que mostró alta eficacia fasciolicida, causando mortalidad entre el 85 al 98% en las 24-72 horas post exposición.

3. Introducción

Las enfermedades parasitarias afectan el rendimiento de los animales de producción y son consideradas como uno de los principales problemas que enfrenta el productor, debido a la acción y presencia de *Fasciola hepatica*. Es la enfermedad hepática más importante del ganado y esta ampliamente difundida a nivel mundial, causando grandes pérdidas económicas, tanto directas como indirectas, debido a que el ganado se infecta con frecuencia (Encinas *et al.* 1989; Quiroz, 2005).

En México, su presencia se ha demostrado en 29 estados y su transmisión se da a través de la ingestión de pastura contaminada, la cual lleva la fase larvaria infectante (metacercaria), que posteriormente migra al hígado (Nari y Fiel, 1988).

Las dos especies comúnmente implicadas son *Fasciola hepatica* y en menor grado pero no menos importante *Fasciola gigantica*.

Esta enfermedad es de ciclo indirecto y requiere de un molusco apropiado como hospedador intermediario, perteneciente a caracoles dulceacuícolas de la familia Lymnaeidae. Como hospedero definitivo utiliza a múltiples especies de pastoreo; principalmente bovinos y ovinos los cuales son especies ganaderas de mayor importancia en el país, sin perder de vista a los caprinos, porcinos, equinos, conejos, entre otros animales herbívoros y omnívoros (Carrada, 2006; Cruz, 2001; Quiroz, 2005).

Es importante mencionar que la fasciolosis constituye también un problema de salud pública a nivel mundial, ya que es considerada como enfermedad zoonótica (Rojo, 1999).

4. Importancia económica

La relevancia de la fasciolosis radica principalmente en cuantiosas pérdidas económicas, las cuales han sido clasificadas en directas e indirectas. Las directas se refiere a cuando la enfermedad aparece bruscamente causando muerte de los animales. Esta condición se da principalmente en los ovinos, debido a una gran ingesta de metacercarias. Sin embargo las pérdidas indirectas son de mayor repercusión, ya que los animales presentan un problema crónico; dado a que existe un retraso en el crecimiento, asociado a una insuficiente conversión alimenticia (síndrome de desnutrición), resequedad de la piel y mala calidad de lana. Así mismo produce trastornos en la reproducción como interferencia en la fertilidad, abortos, disminución de los destetes; baja resistencia a infecciones bacterianas secundarias, además si existe una fasciolosis crónica, asociada a clostridiosis puede disminuir la calidad y cantidad de carne de 8% hasta un 50% y del 20% al 80% de la producción de leche. (Nari y Fiel, 1988; Castellanos, 1992; Quiroz, 2000). Adicionalmente se consideran costos de tratamientos y perdidas por decomiso de hígados parasitados durante el sacrificio del animal en los rastros.

5. Morfología de *Fasciola hepatica*

Adulto: *Fasciola hepatica* es un trematodo cuyo cuerpo es aplanado dorso ventralmente, ancho en la parte anterior y de forma foliácea, formando un cono posterior. Mide de 18 a 50 mm de largo por 4 a 14mm de ancho. Su cuerpo está cubierto por pequeñas espinas; posee una ventosa oral en el extremo anterior, otra ventral a la altura de los hombros, el esófago se bifurca a poca distancia de la ventosa oral, formando ramas primarias y secundarias que se extienden hasta la parte posterior del cuerpo (Soulsby, 1987; Gallego, 2007). Se continúa por una faringe y esófago que se bifurcan formando dos ramas laterales, mismas que se dirigen hacia la porción posterior localizada en la cara ventral a nivel de la parte alargada del cuerpo para terminar en ciegos intestinales. Él parásito es hematófago, por lo que los ciegos se localizan lateralmente y muy bien ramificados. En la porción más amplia, se localiza la ventosa ventral y por debajo de ésta se abre el poro genital en donde las gónadas son también ramificadas presentando dos testículos, colocados en el segundo y tercer cuarto del cuerpo; el útero es corto formando gránulos vitelógenicos que desprenden las células vitelinas en forma de racimos de uva, las cuales contienen proliferol y proteínas ocupando una posición lateral que corresponden a dos bandas oscuras visibles macroscópicamente (Taylor, 1965). Es hermafrodita y vive enrollada sobre si misma en los conductos biliares de sus hospederos. Cada parásito adulto puede llegar a producir hasta 20,000 huevos al día (Astrada, 1971; Quiroz, 2005).

Huevo: Este estadio presenta una forma ovoide y pueden medir de 110 a 150 μm , color amarillento, posee un opérculo y cáscara delgada, el interior está teñido por pigmentos biliares de tonos amarillos, contiene un sincitio embrionario y entre numerosas células vitelinas se localiza el cigoto de color claro y en posición central. Son eliminados junto con las heces y su maduración se efectúa en el agua entre los 9 y 15 días, a una temperatura de 22 a 25°C (Astrada, 1971; Soulsby, 1987).

Miracidio: Es una larva ciliada, que evoluciona después de la maduración del huevo, es de forma triangular; en la parte anterior se encuentra un aparato perforador, constituido por grupos de células indiferenciadas estas células serán transmitidas a los estadios larvarios siguientes y que formarán numerosos elementos de estos estadios evolutivos. Tiene movimientos activos que se favorecen por la luz del sol, así como acción enzimática, desprenden el opérculo del huevo y salen a nadar libremente en busca del hospedador intermediario, el cual es un caracol pulmonado de agua dulce de la familia *Lymnaeidae*, de los géneros *L. cubensis*, *L. obrusa*, *Fosaria humilis*, *F. bulimoides* o *F. viatrix* (Georgi, 1990; Cruz, 2001). El miracidio penetra a través de la cavidad respiratoria o por el tegumento del pie con ayuda de un botón cefálico, localizándose generalmente en las glándulas digestivas “hepatopáncreas” (Georgi, 1990).

Esporocisto: Las larvas miracidio que penetran las células epiteliales del caracol pierden su cubierta de cilios y se vuelven esféricos transformándose en esporoquistes o esporocistos. Posee en el interior células germinales que posteriormente entre 3 y 4 semanas formarán masas de donde se originarán la 1ª y 2ª generación de redias.

Redia: Es un saco alargado lleno de células germinales que se diferencian posteriormente en redias hijas y cercarias. En el extremo anterior tiene una ventosa y un collar anular, en el último tercio del cuerpo posee dos proyecciones laterales, mide 3 mm de largo. La evolución cuantitativa de redias, esta relacionada con el estado nutricional, además de la edad del caracol, un caracol en condiciones óptimas puede llegar a dar origen a segundas generaciones de redias, llegando a producir un miracidio hasta 600 cercarias (Quiroz, 2005).

Cercaria: Después de 6 a 8 semanas las cercarias abandonan a las redias a través de su abertura tocológica y también abandonan a su hospedador intermediario; el caracol por medio de su aparato respiratorio. Las cercarias son larvas libres que nadan activamente en el agua, donde maduran después de abandonar al caracol. Están formadas por un disco oval, que mide de 300 a 350µm y una cola entre 600 y 700µm, la cual utilizan para nadar una vez liberadas en el agua. Están provistas de dos ventosas que conservaran cuando lleguen a la adultez, además de numerosas glándulas cistógenas (Taylor, 1965).

Metacercaria: Es la fase infectante para todos los hospederos definitivos. Son pequeños globos blanquecinos entre 180 y 210µm de diámetro. En esta etapa se pierde la cola y se enquistan para asumir la forma redondeada; se encuentran enquistadas en la vegetación acuática semi-sumergida o en el agua que generalmente comen y beben los animales (Euzebey, 2000; Quiroz, 2005). Al ser consumidas, llegan al duodeno donde se desenquistan liberando a la adolescencia que perfora la pared intestinal alojándose en la cavidad peritoneal. Posteriormente avanza a la cápsula de Glisson, perforándola para llegar al parénquima hepático

del cual se alimentan y migran a los conductos biliares donde se desarrollan hasta la forma adulta y se comienzan a reproducir. Los huevos salen al medio ambiente junto con la bilis y las heces (Taylor, 1965; Astrada, 1971; Almazan 1997).

Hospedador intermediario: Se encuentran limitados a caracoles pulmonados del género *Lymnaea*. Estos caracoles son anfibios, viven en tierra húmeda o en lugares de agua poco profunda y no estancada. En condiciones de sequía o frío, tanto el caracol como los estadios intermediarios, disminuyen su actividad metabólica pudiendo sobrevivir varios meses para reaparecer cuando las condiciones les resulten favorables. La capacidad de reproducción depende de las condiciones ecológicas y de alimentación.

Hospedador definitivo: *Fasciola hepatica* afecta principalmente a animales de pastoreo; principalmente bovinos y ovinos los cuales son especies ganaderas de mayor importancia en México, sin perder de vista a los caprinos, porcinos, equinos, lagomorfos, entre otros animales herbívoros y omnívoros. Además se cuenta con un hospedero accidental, el hombre lo cual ubica a esta enfermedad parasitaria como una Zoonosis. En su forma juvenil se localiza en el peritoneo parietal derecho y en el parénquima hepático. Una vez que alcanza su madurez se localiza en los conductos biliares (Carrada, 2006; Cruz, 2004; Quiroz, 2005).

6. Ciclo evolutivo de *Fasciola hepatica*

Los parásitos adultos, localizados en los conductos biliares del hígado, producen huevos, los cuales son evacuados a través del conducto colédoco al duodeno y de ahí son eliminados al exterior juntamente con las heces (Almazan, 1997; De Haro, 2011).

En el medio ambiente, en condiciones adecuadas de temperatura y humedad, los huevos se desarrollan y liberan embriones ciliados, llamados miracidios, los cuales tienen reservas energéticas para nadar por unas cuantas horas mientras buscan su hospedero intermediario, un caracol de agua dulce del género *Lymnaea*. Si no lo encuentra muere, pero si lo encuentra penetra en el invadiéndolo (Taylor, 1964).

En el interior del caracol el miracidio pierde los cilios modificándose a esporocisto sacciforme, el cual se reproduce asexualmente y produce dos generaciones con varias decenas de redias en forma de saco alargado, con boca e intestinos rudimentarios; (el cuerpo del caracol sirve para amplificar la reproducción del parásito). Cuando la temperatura es favorable, se producen las cercarías mismas que abandonan el caracol, poseen una cola móvil, la cual pierden al cabo de pocas horas, secretan un material mucilaginoso que les permite adherirse a la vegetación circundante. Una vez estando seguras, se enquista, transformándose en metacercaria que constituye la forma infectante (Taylor, 1964; Almazan, 1997; De Haro, 2011).

La infección en el hospedero definitivo se realiza por medio de la ingestión de alimento como forraje verde (berros, lechuga, heno de pastura, alfalfa y hasta ensilados mal elaborados) o agua contaminados con metacercarias (Ibarra, 2014).

En el intestino se disuelve la membrana quística externa quedando libre la forma juvenil, esta penetra activamente a través de la pared del intestino, alcanzando la cavidad peritoneal en un lapso de 24 horas, permaneciendo allí cerca de 15 días. Posteriormente penetra la cápsula de Glisson, llegando al hígado y luego de 6 días después llega al tejido hepático por el que vaga de 6-8 semanas, para finalmente asentarse en los conductos biliares e inicia la puesta de huevos. El tiempo aproximado desde la ingestión, hasta que *Fasciola hepatica* es adulto y capaz de producir huevos es de 8 a 10 semanas (Taylor, 1965; Dalton, 1999).

7. Patogenia y lesiones

La patogenicidad de *F. hepatica* depende del número de metacercarias ingeridas, si es primera infección o si esta reincidiendo, como también el tipo de huésped y su edad. Los ovinos son más susceptibles a la infección que los bovinos y los jóvenes siempre mucho más que los adultos (Dunn, 1983).

La infección se puede presentar de tres formas: aguda, subaguda y crónica.

La forma aguda ocurre en animales que ingieren un alto número de metacercarias en un corto tiempo. Ésta es muy común en los ovinos. Es causada por el tránsito sin rumbo de las fasciolas inmaduras por el hígado de modo que sufren gran

destrucción hepática. La lesión característica es una hepatitis traumática (Taylor, 1965).

La forma subaguda ocurre en animales que ingieren un gran número de metacercarias pero en un periodo más prolongado.

La forma crónica ocurre por la acumulación de parásitos ingeridos durante los 4 y 5 meses previos, pocas veces llega a causar la muerte del huésped y se debe a la presencia del adulto en los conductos biliares. El hígado presenta puntos de abscesos, fibrosis y colangitis hiperplásica, en algunos animales como los bovinos se presenta calcificación de los conductos biliares "calcifilaxis" (Taylor, 1965; Dunn, 1983; Quiroz, 2005). Los bovinos son la única especie que puede expulsar al trematodo, por medio de una inmunidad adquirida de tipo humoral y celular (Ramírez, 2007).

8. Signología

La presencia de este parásito a nivel hepático y en sus estructuras da como consecuencia inflamación peritoneal, edema de epiplón mayor y adherencias laxas al diafragma y a los órganos vecinos. La capsula de Glisson presenta engrosamiento e infiltración leucocitaria formando microabscesos blanquecinos de 2 mm aproximadamente. Se muestran focos necróticos que se originan en el periodo de invasión por parte del parásito, además de zonas con esclerosis. La hiperplasia de los conductos biliares no sólo es provocada por el contacto físico del parásito sino también por medio de inducción química. Debido a que se secreta

prolina que interviene en la síntesis de colágeno en el parásito. Además de que durante la migración del parásito en el huésped se va secretando cisteínas proteasas que favorecen el daño a nivel del tejido hepático (Alcalá, 2005).

Dependiendo de la época del año y el clima, puede haber infecciones masivas. Los signos clínicos que se presentan en la forma aguda son casi inaparentes. En animales muy afectados se puede observar depresión, anorexia, aislamiento, fatiga, mucosas pálidas, abdomen distendido por ascitis, dolor y hasta muerte súbita dado a que ocurre un transito sin rumbo de las fasciolas inmaduras por el hígado. Esta forma aguda se da principalmente en los ovinos jóvenes. Lo que se puede observar en la forma subaguda es anemia por hemorragias, edemas por la hipoalbuminemia y hepatomegalia, además de que existen lesiones en el parénquima hepático debido a la presencia de parásitos adultos en los conductos biliares. Se produce la muerte más tarde a diferencia de la fasciolosis aguda. En cuanto a la infección muchas veces no existen síntomas ni signos hasta ya muy avanzado el tiempo y esto se manifiesta con anemia, edema submandibular, palidez de las mucosas, pérdida de peso, emaciación y en casos extremos la enfermedad degenera produciendo la muerte. En este caso las lesiones y las fasciolas son muy evidentes. Como los signos clínicos de esta enfermedad son muy inespecíficos, se requiere corroborar por medio de una necropsia, para llegar a un diagnostico definitivo (Soulsby, 1987; Olaechea, 1994; Quiroz, 2005).

9. Fasciolosis humana

La fasciolosis humana en México se diagnostica rara vez (Carrada 2006) y en zonas endémicas, va relacionada con bajos niveles socioeconómicos. Otro factor que interviene está referido a costumbres alimenticias inadecuadas, como el consumo de vegetales crudos de tallo corto; (berro, lechuga, alfalfa), en ensaladas o jugos. Además la carencia de servicios de agua potable juega un rol importante, dado a que existen lugares donde las personas se abastecen de agua de ríos, donde los animales fasciolosos, pudieron haber defecado anteriormente y a partir de ahí se pudo generar la infección en humanos. Las personas pueden presentar en la fase aguda procesos de fiebre, dolor del cuadrante abdominal derecho, eosinofilia y hepatomegalia principalmente. La fasciolosis es considerada como una enfermedad emergente y reemergente por la gran capacidad de expansión del agente causal y los hospederos intermediarios, considerados como vectores (Beltrán, 2011; Aguilar *et al.*, 1994).

9. Diagnóstico

El diagnóstico clínico es difícil, ya que comparte signos con otras enfermedades como las parasitosis gastrointestinales, paratuberculosis, salmonelosis inicial, entre otras. En general los síntomas aparecen en los casos de infecciones crónicas. En casos de muerte es fácilmente evidenciar las lesiones y fasciolas adultas, pero en infecciones tempranas es difícil encontrar las fasciolas jóvenes. Por tal razón la

información epidemiológica, la temporada y el conocimiento de la existencia del caracol, acercan más rápido al diagnóstico. En el diagnóstico se utilizan métodos bioquímicos, citológicos, así como también a través de examen coprológico para la detección de huevos. Siendo las técnicas de sedimentación o filtrado las más utilizadas. Los métodos bioquímicos incluyen las modificaciones humorales debido a la lesión hepática, hay importante aumento de la deshidrogenasa glutámica y de la transaminasa glutámica oxalacética. Se considera que la primera se debe al aumento de la lesión hepática y la segunda sobre todo a la lesión muscular. Los métodos citológicos incluyen biopsia hepática y el estudio de lesiones intersticiales y modificaciones citoquímicas, tales como reducción del glicógeno o la elevación del DNA. Mientras que en sangre ocurre una caída del hematocrito y de la albumina, además de que se presenta una eosinofilia, la cual ocurre en animales con fasciolosis aguda, no es específico pero puede tener valor en las formas subaguda. El diagnóstico postmortem se caracteriza principalmente por la lesión de hepatitis traumática hemorrágica, lesión particularmente encontrada en fasciolosis subaguda y la presencia de exudado peritoneal ligeramente hemorrágico así como las placas fibrinosas adheridas a la cápsula de Glisson. El diagnóstico se puede confirmar por la presencia de formas jóvenes de *F. hepatica*. En el diagnóstico antemortem, desde el punto de vista clínico y diferencial, se consideran principalmente los aspectos epizootiológicos. Las pruebas inmunológicas se desarrollan en humanos y en trabajos experimentales, realizándose fijación del complemento, electrotransferencia y ELISA indirecto. (Quiroz, 2005).

11. Quimioterapia contra *Fasciola hepatica*.

El control de esta enfermedad se puede llevar a cabo mediante tratamiento químico por medio de fasciolicidas los cuales son costosos y cada vez menos eficaces debido al uso indiscriminado y erróneo que se hace de ellos, generando día con día serios problemas de resistencia. Estos compuestos fasciolicidas, se dividen en los siguientes grupos químicos:

1. Fenoles halogenados: hexaclorofeno (Bilevon), niclofolan y nitroxinil (trodax)
2. Salicilanilidas: closantel, bromosalan, oxiclosanida y rafoxanida (Ranizole)
3. Bencimidazoles: albendazol, mebendazol, triclabendazol.
4. Sulfonamidas: clorsulon (Ivomec F, curareme ivomec plus)
5. Hidrocarbonados alogenados: tetracloruro de carbono, hexacloroetano.
(Ibarra, 2011).

12. Etnobotánica.

La etnobotánica es una disciplina científica que estudia e interpreta la historia de las plantas en las sociedades tanto antiguas como actuales. Se dedica principalmente a la recuperación y estudio del conocimiento que las sociedades, etnias y culturas de todo el mundo, han tenido y continúan teniéndolo, sobre las propiedades de las plantas y la utilización en sus vidas (Barrera, 1983).

Barrera (2001) define a la etnobotánica como un campo científico que estudia las interrelaciones que se establecen entre el hombre y las plantas, a través del tiempo y en diferentes ambientes. Estas interrelaciones están determinadas por condiciones ecológicas y culturales.

Gutiérrez en el 2003 menciona que esta disciplina estudia y trata de entender la utilidad de las plantas por un grupo humano determinado, es una ciencia interdisciplinaria, apoyada en ciencias naturales y sociales, además menciona que la etnobotánica es importante dado a que la sociedad humana siempre ha tenido un vínculo directo con las plantas, ya que estas satisfacen sus necesidades biológicas y culturales.

Una parte importante vinculada con la eficacia o actividad antiparasitaria son los metabolitos secundarios de la planta en estudio. Entre los metabolitos que han demostrado actividad contra una amplia gama de parásitos se encuentran: alcaloides, saponinas, skimmiaepinas A y C, taninos o flavonoides, terpenos (4 Di-terperno, monoterpenos) y xantonas. Estos compuestos actúan de diversas maneras, algunos actúan como inmuno-moduladores modificando la interacción parásito-huésped estimulando los mecanismos de defensa, aumentando la proteína de paso y formando compuestos con aminoácidos que pertenecen a la cutícula de los parásitos (Álvarez 2013).

Una planta medicinal es un recurso cuyas partes o extractos se emplean como drogas en el tratamiento de alguna afección. Esa parte o extracto empleada medicinalmente se le conoce como droga vegetal y puede suministrarse bajo

diferentes formas. Actualmente cientos de plantas se utilizan en la medicina, los cuales se han analizado y estudiado los efectos terapéuticos de pocas de ellas, con la finalidad de conocer los principios activos responsables de aliviar y curar ciertas enfermedades (Aguilar *et al.*, 1994).

El uso de plantas taniníferos ha sido sugerido como una alternativa a los antihelmínticos químicos comerciales para el control de nematodos gastrointestinales (NGI) en pequeños rumiantes (Hoste *et al.*, 2006; Alonso *et al.*, 2008).

Un ejemplo relacionado con el uso de plantas es aquel estudio realizado por Ávila *et al.*, (1998), quienes evaluaron el modo de acción del verbascósido obtenido de *Buddleja cordata* (Tepozán) sobre *Staphylococcus aureus*, dando como resultado que el verbascósido indujo un efecto letal en *S. aureus* porque afecta la síntesis de proteínas e inhibe la incorporación de leucina.

Otros experimentos *in vitro* como el de Pineda en el 2013, señala la actividad antimicrobiana demostrando que *Psidium guajava* (Guayaba), como extracto etanólico de hojas, inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella entérica ser. Typhimurium*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli*.

El árbol de *Jacaranda mimosifolia* (Jacaranda), ha sido ampliamente estudiado desde el punto de vista farmacológico. Las partes aéreas, la flor, fruto y semillas, así como la corteza presentan propiedades antibacterianas y amebicida, tanto a nivel de extracto como de compuesto puro, mostrando así la efectividad en

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* *Pseudomonas sp.* y *Entamoeba histolytica* (Torres *et al.*, 2005).

De *Mangifera indica* (Mango), se han evaluado extractos de diferente polaridad a partir de semillas y hojas, demostrando sus propiedades antibacterianas (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas auruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Giardia duodenalis*,) y antihelmínticas (*Ascaris lumbricoides* y *Haemonchus contortus*). También al mango se le ha determinado la dosis letal media del extracto etanólico-acuoso de sus partes aéreas en el ratón la cual fue de (LD₅₀) 1g/Kg, cuando se administró por vía intraperitoneal (Torres *et al.*, 2005).

De acuerdo a algunos estudios por el Grupo Malaria U de A, mencionan que *Persea americana* (Aguacate oloroso) presento actividad antimalárica (Blair y Madrigal 2005).

Así mismo, se ha demostrado el efecto *in vivo* con el uso del extracto de *Ricinus communis* (Higuerilla) contra *Paramphistomum cervi*, en ovinos (Zahir *et al.*, 2012).

De igual manera con los extractos de hojas de *Dregea volubilis* sobre *Paramphistomum explanatum* en búfalos (Hossain *et al.*, 2012).

También Dublín *et al.*, (2012) evaluaron la eficacia del extracto acuoso de hojas de Neem (*Azadirachta indica* A. Jess) en el control de nematodos gastrointestinales en ovinos, obteniendo 100% de reducción contra los géneros *Strongyloides*, *Haemonchus*, *Ostertagia* y *Trichostrongylus*.

En cuanto al aspecto económico se sabe que Pakistán exporta un gran número de plantas generando montos anuales por arriba de 10.5 millones dólares (Sher *et al.*, 2014).

Dado a lo anterior los extractos de plantas mexicanas provienen de plantas comunes, se pueden conseguir fácilmente, lo cual hacen que su manejo y obtención sea a bajo costo, además de que una vez obtenidos los extractos son de fácil almacenamiento.

Por otro lado, México es un país caracterizado por contar con un número considerable de plantas, conocido a través de la herbolaria mexicana. Estos antecedentes datan desde tiempos de los Aztecas, quienes utilizaron las plantas para curar enfermedades, incluyendo en ocasiones las enfermedades parasitarias. Estos extractos de plantas mexicanas provienen de plantas comunes, se pueden conseguir fácilmente, lo cual hacen que su manejo y obtención sea a bajo costo, además de que una vez obtenidos los extractos son de fácil almacenamiento.

13. Justificación.

Uno de los grandes problemas que hoy en día se presenta con mayor frecuencia en términos de control parasitario, es el fenómeno de resistencia a los fármacos por parte del parásito. Dentro de las causas que más se señalan para la aparición de este fenómeno es el uso irracional o subdosificación frecuente de un mismo fármaco. Adicionalmente se menciona la utilización de familias idénticas de fasciolidas, cálculos incorrectos de dosis o uso indiscriminado de compuestos.

Estas medidas incorrectas de control quimioterapéutico han generado daños secundarios o estado de intoxicación en los animales que adicionalmente contribuyen a la contaminación y daño del medio ambiente por causa de la eliminación frecuente de estos compuestos químicos en las praderas.

Por otro lado, se postula que es de suma importancia el cuidado y medición de la contaminación ambiental lo cual sugiere buscar nuevas alternativas para disminuir la contaminación de praderas con estos compuestos químicos.

Con base en esta reflexión de buscar una nueva alternativa de control de la fasciolosis, se propone en este trabajo identificar de manera preliminar cual o cuales extractos de plantas mexicanas pueden mostrar actividad fasciolida de forma natural, utilizando un sistema de evaluación bajo condiciones *In Vitro*.

14. Hipótesis:

Alguno de los 14 extractos de plantas mexicanas a evaluar tendrán una eficacia fasciolicida superior al 90% bajo condiciones *in vitro*.

15. Objetivo:

Evaluar bajo condiciones *in vitro* la eficacia fasciolicida de 14 extractos hexánicos de plantas mexicanas.

16. Material y métodos:

16.1. Localización del estudio:

El presente estudio fue realizado en el laboratorio de Quimioterapia Experimental del departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

16.2. Obtención de extractos:

Los extractos de plantas se seleccionaron a partir de un listado obtenido del herbario UNAM IZTA, elaborado en base al conocimiento del uso popular de varias plantas, empleadas en la salud humana (Cuadro 4). Éstos extractos fueron proporcionados por el laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Estudios

Superiores Iztacala de la UNAM y el Departamento de Fitoquímica de la UAM Xochimilco. Los extractos utilizados en ésta evaluación fueron:

1. *Persea americana* Mill (Aguacate oloroso 2154 IZTA)
2. *Arachis pintoii* Krapov. & W:C: Gregory var. AP17434 (Cacahuete forrajero 2170 IZTA)
3. *Theobroma cacao* L. (Cacao 2150 IZTA)
4. *Bursera simaruba* L. Sarg (Chaca 21 52 IZTA)
5. *Cratylia argentea* (Desv.) Kuntze var. Veranera, (Cratylia 2167 IZTA)
6. *Bocconia frutescens* (Gordolobo 2153 IZTA)
7. *Guazuma ulmifolia* Lam (Guasima 2167 IZTA)
8. *Psidium guajava* L. (Guayaba 2168 IZTA)
9. *Jacaranda mimosifolia* (Jacaranda)
10. *Mangifera indica* L (Mango 2151 IZTA)
11. *Carica papaya* (Papaya)
12. *Melia azederach* L. (Poicho 2161 IZTA)
13. *Struthanthus* sp (Seca palo 2148 IZTA)
14. *Buddleja cordata* (B-cordata o tepozán).

Éstos extractos hexánicos fueron entregados en cajas de Petri y se colocaron en refrigeración hasta su evaluación.

16.3. Procedimiento para la elaboración de extractos.

Se obtuvo 700 g de cada planta a utilizar, incluyendo: tallo, flor y hojas. Se dejó secar en un horno por 3 días a 60°C.

Se utilizó 100g de materia seca de cada planta y se le adicionó 500ml del solvente hexano, después con ayuda de un rota evaporador soxlet® se destiló el contenido del solvente hexano a 40°C y 50 RPM.

Para cada planta se realizaron 3 destilaciones, 1 cada 3 días. Posteriormente los extractos fueron colocados y etiquetados en cajas de Petri para finalmente ser almacenados en refrigeración.

16.4. Evaluación fasciolicida *in vitro* de los extractos:

Las actividades aquí descritas fueron llevadas a cabo de acuerdo a lo realizado por Ibarra y Jenkins en 1984 y Rivera *et al.*, 2004.

Obtención de Metacercarias.- Se utilizaron metacercarias de *F. hepatica* obtenidas a partir de la infección de caracoles *Lymnaea humilis* con miracidios de origen bovino obtenidos de huevos colectados de vesículas biliares procedentes del rastro de Toluca, Edo. de México.

Extractos hexánicos de plantas.- Estos fueron proporcionados por colaboradores de la FES-Iztacala-UNAM.

Desenquistamiento artificial de metacercarias.- Las metacercarias de *F. hepatica* a utilizar fueron depositadas en un tubo universal (capacidad de 30 ml) en donde se desenquistaron de acuerdo a lo realizado por Ibarra y Jenkins (1984). Brevemente el método consiste en una Fase de Activación en donde se pesan 0.040 g de ditionato de sodio + 10 ml. de agua destilada y se les proporciona un burbujeo con CO₂ durante 3 minutos. Posteriormente se elimina la mayor cantidad del medio de activación mediante dos lavados con 20 ml de agua destilada. Las metacercarias se mantienen en esas condiciones durante 2 horas con la finalidad de presionarlas a que salgan de su quiste. Seguidamente viene la Fase de Emergencia en donde las metacercarias se colocan en un frasco universal conteniendo 4.5 ml de solución de Hank's + 0.5 ml de bilis de bovino (5 ml de volumen total) y se incuban a 37°C

y durante 2 horas más. En esta etapa las adolecarias desequistan y quedan libres para ser utilizadas en la evaluación *in Vitro*. Finalmente las adolecarias recién desequistadas se incuban a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% hasta su utilización.

Medio de cultivo.- Se utilizaron 90 ml de medio RPMI-1640[®] con glutamina, mezclado en partes iguales con suero bovino y 1.5 ml de penicilina.

Desarrollo del Estudio.-

Se utilizaron 500 mg de extracto crudo de cada planta los cuales fueron puestos en tubos eppendorf y se les añadió 20 µl de hexano para disolver el extracto. Este se aforó a 10ml y se elaboraron las diluciones correspondientes para obtener concentraciones de 500, 375, 250 y 125 mg/L.

Seguidamente se utilizaron cajas estériles de cultivo de 24 pozos marca NUNC en donde se depositaron 0.2 ml del extracto hexánico solubilizado; 1.6 ml de medio de cultivo y 0.2 ml de medio de cultivo conteniendo 10 adolecarias/pozo para tener un volumen total de 2.0 ml.

Por cada placa, se utilizaron 4 pozos testigo sin tratamiento, mismos que solamente contenían el medio de cultivo y hexano utilizado para diluir los extractos.

De esta manera los extractos vegetales fueron probados por triplicado y aquellos que mostraron mayor actividad fueron re-evaluados en 3 ocasiones más, con el fin de corroborar los resultados de eficacia obtenidos (Ibarra, 1997). Cada prueba permaneció en incubación a 37°C durante 4 días bajo una atmósfera de CO₂ al 5%.

16.5. Interpretación de la Prueba:

Las fasciolas bajo estudio fueron examinadas a las 24, 42 y 72 horas posexposición utilizando un microscopio invertido a 40X. La actividad adolestaricida de los extractos fue medida por comparación de la sobrevivencia de las adolestaricias de los grupos tratados con relación a las adolestaricias del grupo testigo sin tratamiento. Todos los procedimientos fueron realizados bajo condiciones de semi-esterilidad, utilizando una campana de flujo laminar horizontal y un mechero.

16.6. Medición de la eficacia

La eficacia fue medida utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Eficacia (\%)} = \frac{\text{No. de adolestaricias en grupo testigo} - \text{Menos el No. de adolestaricias en grupo tratado}}{\text{Dividido entre el No. de adolestaricias en grupo testigo}} \times 100$$

Una vez observado que el extracto mostraba una eficacia superior al 80% se consideraba que poseía actividad fasciolicida (Ibarra y Jenkins; 1984).

16.7. Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA), para evaluar la eficacia fasciolicida entre dosis, tiempo y concentraciones de cada extracto.

17. Resultados

Los resultados obtenidos se pueden apreciar en los cuadros 1, 2, 3 y en la Figura 1.

De los 14 extractos hexánicos evaluados, se observó que a las 24 hrs. Post exposición *Psidium guajava* (guayabo), *Jacaranda mimosifolia* (jacaranda) y *Buddleja cordata* (tepozán) mostraron una eficacia limitada no mayor al 70%.

Sin embargo, el extracto de *Bocconia frutescens* (gordolobo) mostró una eficacia fasciolicida superior al 80%, en la concentración de 500 mg/L., (Cuadro 1).

| Cuadro 1. Eficacia fasciolicida <i>in vitro</i> de extractos de plantas mexicanas a las 24 hrs. | | | | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Nombre común | Nombre científico | Eficacia (%) | | | | |
| | | Testigo 0 mg/L | 125 mg/L | 250 mg/L | 375 mg/L | 500 mg/L |
| Aguacate oloroso | <i>Persea americana Mill</i> | 0 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a |
| Cacahuete forrajero | <i>Arachis pintoi</i> | 0 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a |
| Cacao | <i>Theobroma cacao</i> | 0 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a |
| Chaca | <i>Bursera simaruba L. Sarg</i> | 0 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a |
| Cratylia | <i>Cratylia argentea</i> | 0 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a |
| Gordolobo | <i>Bocconia frutescens</i> | 0 | 4±0.08 ^b | 60±0.11 ^b | 75±0.22 ^b | 88±0.22 ^b |
| Guasima | <i>Guazuma ulmifolia</i> | 0 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a |
| Guayabo | <i>Psidium guajava</i> | 0 | 0 ^b | 6.7±0.02 ^b | 40±0.01 ^b | 53.3±0.22 ^b |
| Jacaranda | <i>Jacaranda mimosifolia</i> | 0 | 0 ^b | 3.3±0.01 ^b | 43±0.22 ^b | 60±0.01 ^b |
| Mango | <i>Mangifera indica</i> | 0 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a |
| Papaya | <i>Carica papaya</i> | 0 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a |
| Piocho | <i>Melia azedarach</i> | 0 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a |
| Seca palo | <i>Struthanthus sp.</i> | 0 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a |
| Tepozán | <i>Buddleia cordata</i> | 0 | 3.33±0.02 ^b | 23.3±0.04 ^b | 56.6±0.22 ^b | 66.6±0.22 ^b |

El cuadro 2 nos muestra que a las 48 horas las fasciolas de los grupos experimentales tratados se encontraban en buena actividad y movilidad excepto los del grupo de *Psidium guajava* (guayabo), *Jacaranda mimosifolia* (jacaranda), *Buddleja cordata* (tepozán) y por supuesto *Bocconia frutescens* (gordolobo) el cual aumentó su eficacia a 90% en la concentración de 500 mg/L.

| Cuadro 2. Eficacia fasciolicida <i>in vitro</i> de extractos de plantas mexicanas a las 48 hrs posexposición | | | | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Nombre común | Nombre científico | Eficacia (%) | | | | |
| | | Testigo 0 mg/L | 125 mg/L | 250 mg/L | 375 mg/L | 500 mg/L |
| Aguacate oloroso | <i>Persea americana Mill</i> | 0 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a |
| Cacahuete forrajero | <i>Arachis pintoi</i> | 0 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a |
| Cacao | <i>Theobroma cacao</i> | 0 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a |
| Chaca | <i>Bursera simaruba L. Sarg</i> | 0 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a |
| Cratylia | <i>Cratylia argentea</i> | 0 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a |
| Gordolobo | <i>Bocconia frutescens</i> | 0 | 4±0.08 ^b | 65±0.11 ^b | 80±0.22 ^b | 90±0.22 ^b |
| Guasima | <i>Guazuma ulmifolia</i> | 0 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a |
| Guayabo | <i>Psidium guajava</i> | 0 | 0 ^b | 10±0.01 ^b | 40±0.01 ^b | 56.6±0.22 ^b |
| Jacaranda | Ç <i>Jacaranda mimosifolia</i> | 0 | 0 ^b | 3.3±0.02 ^b | 46.6±0.02 ^b | 70±0.01 ^b |
| Mango | <i>Mangifera indica</i> | 0 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a |
| Papaya | <i>Carica papaya</i> | 0 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a |
| Piocho | <i>Melia azedarach</i> | 0 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a |
| Seca palo | <i>Struthanthus sp.</i> | 0 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a |
| Tepozán | <i>Buddleia cordata</i> | 0 | 3.33±0.02 ^b | 26.6±0.02 ^b | 56.6±0.02 ^b | 80±0.06 ^b |

Finalmente el cuadro 3 nos muestra la eficacia conferida por *Theobroma cacao* (cacao), *Psidium guajava* (guayabo), *Jacaranda mimosifolia* (jacaranda) y *Mangifera indica* (mango) generando como máximo: 70%, 66.6%, 73.3% y 66.6% respectivamente, en la más alta concentración evaluada (500 mg/L). Dado a que estos resultados son inferiores al 80% se puede considerar que estos extractos no presentan actividad significativa, indicando que aparentemente no poseen eficacia fasciolicida.

| Cuadro 3. Eficacia fasciolicida <i>in vitro</i> de extractos de plantas mexicanas a las 72 hrs. | | | | | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Nombre común | Nombre científico | Eficacia (%) | | | | |
| | | Testigo 0 mg/L | 125 mg/L | 250 mg/L | 375 mg/L | 500 mg/L |
| Aguacate oloroso | <i>Persea americana Mill</i> | 0 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a |
| Cacahuete forrajero | <i>Arachis pintoi</i> | 0 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a |
| Cacao | <i>Theobroma cacao</i> | 0 | 0 ^b | 0 ^b | 0 ^b | 70±0.08 ^b |
| Chaca | <i>Bursera simaruba L. Sarg</i> | 0 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a |
| Cratylia | <i>Cratylia argentea</i> | 0 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a |
| Gordolobo | <i>Bocconia frutescens</i> | 0 | 7±0.08 ^b | 69±0.11 ^b | 85±0.22 ^b | 98±0.22 ^b |
| Guasima | <i>Guazuma ulmifolia</i> | 0 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a |
| Guayabo | <i>Psidium guajava</i> | 0 | 3.33±0.02 ^b | 16.7±0.02 ^b | 43.3±0.22 ^b | 66.6±0.22 ^b |
| Jacaranda | <i>Jacaranda mimosifolia</i>) | 0 | 0 ^b | 6.6±0.02 ^b | 50±0.11 ^b | 73.3±0.22 ^b |
| Mango | <i>Mangifera indica</i> | 0 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 66.6±0.22 ^b |
| Papaya | <i>Carica papaya</i> | 0 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a |
| Piocho | <i>Melia azedarach</i> | 0 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a |
| Seca palo | <i>Struthanthus sp.</i> | 0 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a |
| Tepozán | <i>Buddleia cordata</i> | 0 | 13.3±0.02 ^b | 33.3±0.02 ^b | 63.3±0.08 ^b | 83.3±0.22 ^b |

Es importante señalar que *Bocconia frutescens* (gordolobo) aumentó su eficacia hasta un 98%, así como *Buddleja cordata* (tepozán) que registró una eficacia de 83.3% en la concentración más alta (500 mg/L). Esto indica que alguno de los componentes (hoja, flor o tallo) de estos extractos, confiere una alta actividad fasciolicida.

Con relación a los grupos controles sin tratamiento, las fasciolas siempre se mantuvieron muy activas y en constante movimiento, aumentando en tamaño y sin registrar ninguna baja en cuanto a aspectos de mortalidad.

De acuerdo al ANOVA, realizado a los extractos de plantas que tuvieron un efecto fasciolicida; se muestra que a las 24 horas postexposición, los grupos utilizados poseen una F de 0.77 y un valor crítico de 4.46, por lo tanto se observa una variación entre el tipo de planta utilizada a las 24 horas. Sin embargo, por dosis se obtiene una F de 1.8 y un valor crítico de 2.8 indicando que no hay variación entre las dosis de extracto utilizado en cada experimento.

A las 48 horas post exposición entre los grupos de extractos de plantas se obtuvo una F 0.81 de y un valor crítico de 2.41, por lo tanto se observa una ligera variación entre el tipo de planta utilizada. Sin embargo, por dosis se obtiene una F 0.79 y un valor crítico de 1.6 por lo que no se observó variación significativa entre las dosis de extracto utilizadas.

Finalmente a las 72 horas post exposición, se observó una F de 2.1 y un punto crítico de 3.88, por lo que si hay variación entre extractos utilizados, pero por dosis

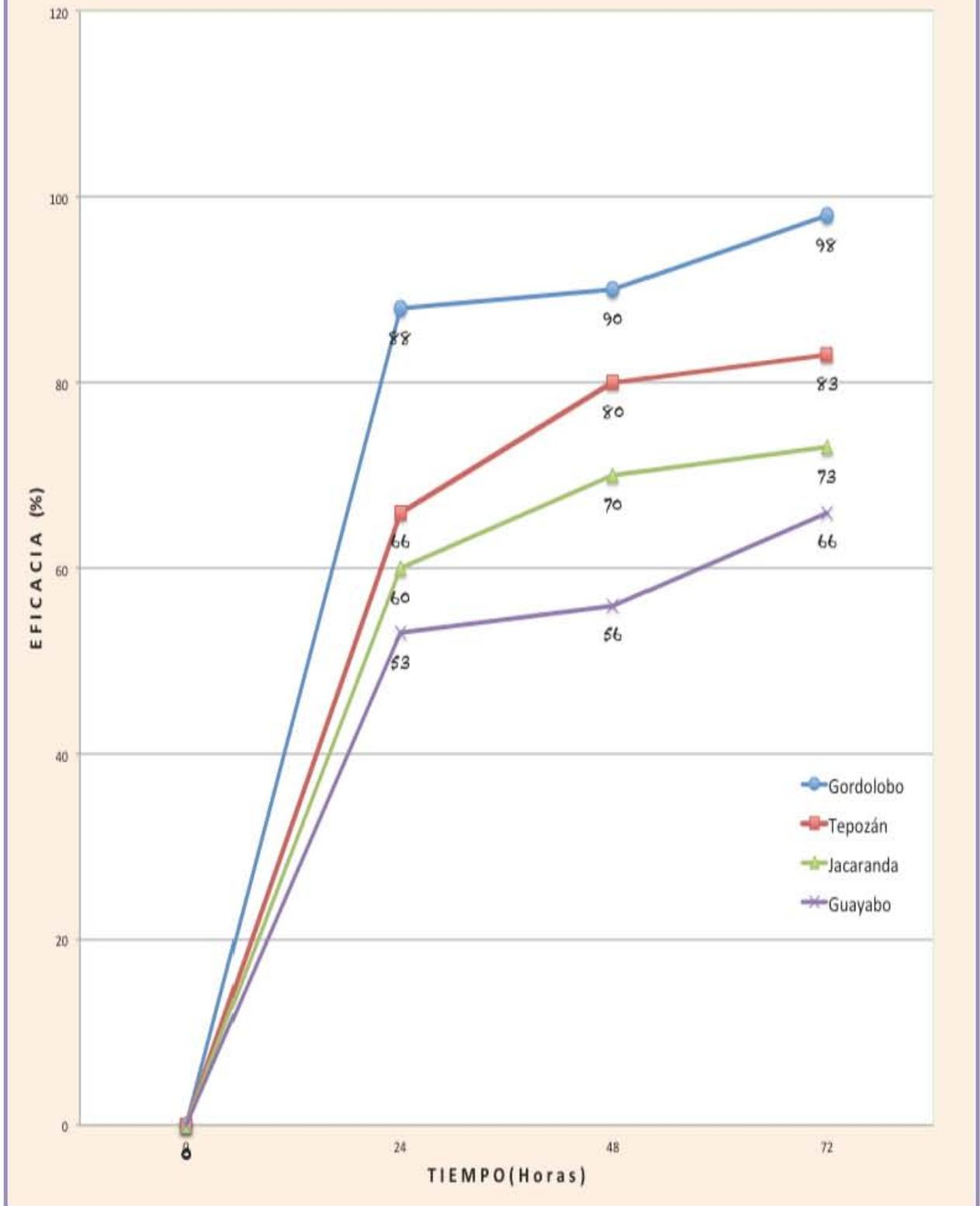
se presenta una F de 0.24 y un punto crítico de 1.32, indicando que no existió variación entre las dosis utilizadas.

Asimismo, se puede observar que en los distintos tiempos post exposición (24, 48 y 72 horas), si hubo diferencias significativas en la eficacia fasciolicida de los extractos utilizados. Sin embargo, no hay una diferencia significativa demostrada con respecto a las concentraciones utilizadas.

La Figura 1 nos muestra en forma gráfico-lineal la eficacia en tiempo de los extractos de plantas que mostraron mayor actividad fasciolicida *In Vitro*.

Estos extractos [*Bocconia frutescens* (gordolobo); *Psidium guajava* (guayabo); *Jacaranda mimosifolia* (jacaranda) y *Buddleja cordata* (tepozán)], mostraron cierto grado de eficacia, la cual fue ejercida de forma constante en las horas postexposición. No obstante, solo 2 extractos; *Bocconia frutescens* (gordolobo) y *Buddleja cordata* (Tepozán) presentaron actividad relevante a las 72 horas, pero sin duda alguna al final de la evaluación *Bocconia frutescens* (gordolobo) presentó una eficacia altamente significativa del 98% en la concentración de 500 mg/L.

Figura 1. Porcentaje de Eficacia de los cuatro extractos que mostraron mayor actividad fasciolicida a las 24, 48 y 72 hrs. postexposición en una concentración de 500 mg/L.*



* = Los diez extractos restantes, mostraron nula o baja eficacia.

Con el fin de proporcionar al lector mayor información sobre algunas características de los extractos evaluados, a continuación se incorpora el siguiente cuadro:

| Cuadro 4. Características de los extractos de plantas mexicanas proporcionados por la FES-Iztacala | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NOMBRE CIENTÍFICO | FAMILIA | NOMBRE POPULAR | USOS EN ETNOBOTÁNICA |
| <i>Struthanthus sp</i> | LORANTHACEAE | Seca palo | Parásitos, lombrices, amibas, en principios de tuberculosis, en problemas de salpullido y rubiola. |
| <i>Theobroma cacao L.</i> | STERCULIACEAE | Cacao | Antioxidante, arritmias, hipertensión arterial, para la memoria, edema, fatiga muscular, diurético. |
| <i>Mangifera indica L.</i> | ANACARDIACEAE | Mango | Antibronquítico, mucolítico, laxante, estreñimiento, indigestión, gastritis, úlceras gástricas, espasmos, control de hipertensión (Torres <i>et al.</i> , 2005), |
| <i>Bursera simaruba L. Sarg</i> | BURSERACEAE | Chaca | Calma los nervios, ayuda al control de presión arterial. |
| <i>Persea americana Mill</i> | LAURACEAE | Aguacate oloroso | Abscesos, parásitos intestinales, dolores reumáticos, regula el ciclo menstrual, golpes, dolor de estomago (García, 2010; Torres <i>et al.</i> , 2005). |
| <i>Melia azederach L.</i> | MELIACEAE | Piocho | Parásitos intestinales, analgésico, antiinflamatorio, dolores reumáticos, problemas de sarna, tiña, fomenta el crecimiento de pelo. |
| <i>Guazuma ulmifolia Lambert</i> | STERCULIACEAE | Guasima | Antioxidante, astringente, problemas pancreáticos. |
| <i>Psidium guajava L.</i> | MYRTACEAE | Guayabo | Parásitos intestinales, diarreas (García, 2010) . |
| <i>Arachis pintoi Krapov. & W:C: Gregory var. AP17434</i> | FABACEAE/ LEGUMINOSAE | Cacahuete forrajero | Hipercolesterolemia, estreñimiento. |
| <i>Cratylia argentea (Desv.) Kuntze var. Veranera</i> | FABACEAE/ LEGUMINOSAE | Cratylia | |
| <i>Carica papaya</i> | CARICACEAE | Papaya | Analgésico, laxante, antiséptico, estreñimiento, problemas de hígado y dermatológicos. |
| <i>Jacaranda mimosifolia)</i> | BIGNONIACEAE | Jacaranda | Antimicrobiano, antihelmíntico y desparasitante (Torres <i>et al.</i> , 2005) |
| <i>Buddleia cordata</i> | LOGANIACEAE | Tepozán | Diurético, heridas e inflamación de la piel, problemas dermatológicos, trastornos digestivos, úlceras, dolor de garganta. |
| <i>Bocconia frutescens</i> | PAPAVERACEAE | Gordolobo | Problemas respiratorios, expectorante, activa la circulación sanguínea. |

18. Discusión

Hoy en día es una realidad que el uso de plantas representa una alternativa viable para buscar eficacia antihelmíntica y particularmente contra *Fasciola hepatica*. Como anteriormente se mencionó, cada vez es mas frecuente la presencia del fenómeno de resistencia por parte de *F. hepatica* hacia los fasciolicidas, lo cual motiva a buscar una diferente alternativa de control.

El presente estudio muestra una evaluación biológica muy modesta y preliminar de solamente 14 extractos, de los cuales *Bocconia frutescens* (gordolobo) y *Buddleja cordata* (tepozán) generaron una eficacia de 98% y 83.3% respectivamente, en la concentración de 500 mg/L. Este resultado motiva a realizar un estudio más completo sobre determinación de la parte activa de la planta que confiere esta actividad fasciolicida así como estudios continuados sobre toxicidad y evaluaciones biológicas en el huésped natural.

En un estudio similar realizado por Álvarez, en el 2013, también se evaluó a un extracto hexánico de *Bocconia frutescens* (gordolobo). El autor reporta una eficacia del 100%, desde las primeras 24 horas posinfección a la concentración de 500 mg/L., lo que permite corroborar de alguna manera la actividad fasciolicida que posee este extracto.

Ibarra, (2014) trabajó con el extracto hexánico de *Buddleja cordata* (tepozán), pero ella no reporta eficacia alguna en su evaluación. Como justificación a este resultado se puede aducir que el material biológico utilizado puede sufrir modificaciones al ser evaluado. En este estudio los extractos evaluados se realizaron a partir del tallo, flor y hoja evitando utilizar raíz y fruto debido a que ahí puede encontrarse las

partes tóxicas de la planta, por lo que se manifiesta importante dar continuidad a estudios determinando los metabolitos secundarios de estas plantas de los cuales posiblemente se podrá determinar en donde se encuentra la actividad fasciolicida.

Rodríguez *et al.*, (1999), evaluaron la actividad amebicida del tepozán en cepas de *Acanthamoeba* y se obtuvo que tanto el extracto acuoso como metanólico fueron amebostáticos en un 95% para dos cepas de amibas de vida libre. Se reporta linarina y ácido vanílico de los extractos aunque sólo la liranina fue amebostática.

Díaz *et al.*, (2000), reportan que el extracto de metanol tuvo un efecto parasiticida sobre *Costia necatrix* en tilapia (*Oreochromis sp.*) ya que mató al 83.34%, 97.92% y 100% de los parásitos a dosis de 25mg/L, 50mg/L y 100mg/L respectivamente. Se identificó al verbascósido, a través de cromatografía en placa fina.

Así mismo Hördegen *et al.*, (2006) evaluaron 6 extractos de productos de plantas *in vitro* contra *Haemonchus contortus* (*Ananas comosus* (Bromeliaceae), *Azadirachta indica* (Meliaceae), *Caesalpinia crista* (Caesalpinaceae), *Vermonia anthelmintica* (Asteraceae), *Fumaria parviflora* (Papaveraceae) y *Embelia ribes* (Myrsinaceae)), ellos mostraron una eficacia por arriba del 93% comparada contra tartrato de pirantel utilizado como fármaco de referencia.

Por otro lado, Ferreira *et al.*, (2011), evaluaron *in vitro* el efecto trematodicida de extractos crudos de *Artemisia annua*, *A. absinthium*, *Asimina triloba* y *Fumaria officinalis*. Sus resultados mostraron que a 2mg/ml comenzaron a matar *Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepatica* y *Echinostoma caproni* a las 20 horas de exposición, aunque se requirió de mas tiempo para matar a todos los trematodos.

De manera general se pudo observar a través del microscopio invertido, que los extractos evaluados en el presente estudio causan una relajación, además de la desintegración de órganos internos y de su pared corporal; estas características también son causadas por el efecto de fasciolicidas comerciales por lo que es importante señalar que estos extractos pueden provocar efectos similares reafirmando con ello que los extractos de plantas pueden representar una alternativa viable para el control de la fasciolosis hepática en el ganado.

Es importante mencionar que hasta ahora no existen referencias donde se haya evaluado la actividad fasciolicida de los demás extractos de plantas utilizados en este estudio excepto la de *Bocconia frutescens* (gordolobo) citada por Álvarez (2013) y *Buddleja cordata* (tepozán) citada por Ibarra (2014).

Por lo anteriormente mencionado se puede señalar que la información disponible tanto en nuestro país como a nivel mundial de extractos con posible potencial fasciolicida es muy escasa, razón por la que es importante realizar el escrutinio de la actividad biológica a mayor escala en la búsqueda de un fasciolicida experimental.

Futuros estudios permitirán conocer los analitos causantes de esta eficacia fasciolicida *in vitro*, para posteriormente pensar en posibles estudios *in vivo* los cuales permitirán determinar la eficacia fasciolicida real de este extracto.

19. Conclusión

Bajo las condiciones en que se desarrolló el presente estudio se encontró que de los 14 extractos evaluados bajo condiciones *in Vitro* *Bocconia frutescens* (Gordolobo), mostró alta eficacia fasciolicida, causando mortalidad entre el 85 al 98% en las 24-72 horas post exposición.

20. Referencias

1. Aguilar A, Camacho R, Chino S, Jácquez P, López E. Plantas medicinales del herbario del IMSS. Cuadros básicos por aparatos y sistemas del cuerpo humano. Instituto Mexicano del Seguro Social. México. 1994.
2. Alcalá Y, Ibarra VF, García J, Sumano H. *Fasciola hepatica* proteolytic activity in liver revealed by in situ zymography. *Parasitol Rev*, 2005; 96(3): 308-311.
3. Almazan GM. Detección de antígenos de *Fasciola hepatica* en heces y suero de ovinos por medio de ELISA. (Tesis de Maestría en Ciencias Veterinarias). México, D.F., Universidad Nacional Autónoma de México, 1997.
4. Alonso DM, Torres AJ, Sandoval CC, Capetillo LC, Brunet S, Hoste H. Effects of four tropical tanniferous plant extracts on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. *Veterinary Parasitology*. 2008; 153:187-192. DOI:10.1016/j.vetpar2008.01.011
5. Álvarez MJ. Valoración *in vitro* de la eficacia anti-fasciola de extractos de plantas de Veracruz, México. (Tesis de Licenciatura). México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México, 2013.
6. Astrada MT. Ciclo evolutivo de *Fasciola hepatica*. Ed. Córdoba. 1971.
7. Ávila J, de Liverant J, Martínez A, Martínez G, Muñoz J, Arciniegas A, Romo A. Mode of action of *Buddleja cordata* verbascoside against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 1998; 66 (1): 75-78.
8. Barrera A. Catálogo del museo de etnobotánica de Córdoba España. 1983. URL:<http://www.uco.es/organiza/servicios/jardin/etnobot.html>.
9. Barrera A. La etnobotánica: tres puntos de vista y una perspectiva. Sexta reimpresión, Programa Nacional de Etnobotánica; Universidad Autónoma de Chapingo. México, 2001.

10. Beltrán FM, Muñoz ZE, Del Pozo LF, *et al.* Fascioliasis coledociana por *Fasciola hepatica* en cirugía de colecistitis crónica calculosa. Anales Facultad de Medicina. Lima, Perú. 2011; 72(2): 141-145.
11. Blair TS., Madrigal B. Plantas antimaláricas de Tumaco: Costa Pacifica Colombiana. Ed Universidad de Antioquia, Colección Ciencia y Tecnología. 1ª ed. Medellín, Colombia 2005.
12. Carrada BT. *Fasciola hepatica*: Investigación clínico-epidemiológica. *Rev. Gastroenterol Méx.* 2006; 71: 2-7.
13. Castellanos HA, Escutia SI, Quiroz RH. Frecuencia de fasciolosis hepática en bovinos sacrificados en plantas Tipo Inspección Federal en México de los años 1979-1987. *Vet Méx.* 1992; 23: 339-342.
14. Cruz MI. Identificación, ciclo de vida, dinámica poblacional, grado de infección de caracoles y transmisión de fasciolosis bovina bajo condiciones de campo y de laboratorio (Tesis de Doctorado en Ciencias Veterinarias). México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México, 2001.
15. Cruz MI, Figueroa JA, Correa D, Ramos ME, Lecumberri LJ, Quiroz RH. Dynamics of *Fasciola hepatica* infection in two species of snails in a rural locality of México. *Vet. Parasitol.* 2004; 87: 87-93.
16. Dalton JP. Fasciolosis. United Kingdom: Wallingford, 1999.
17. De Haro AI. Fasciolosis. En: Becerril FM. Parasitología médica. 3ª ed., Ed. McGraw Hill Interamericana. México, 2011.
18. Díaz B, Jiménez EM, Auró A. Evaluación del efecto parasiticida de los extractos acuoso y metanólico de *Buddleja cordata* HBK (Tepozán) sobre *Costia necatrix* en tilapia (*Oreochromis* sp). *Revista Veterinaria México.* 2000; 31 (3): 185-194.
19. Dublín DR., Roque LE., Estrada OJ., Eficacia del extracto de las hojas del Neem *Azadirachta indica* A. Juss en el control de nematodos gastrointestinales en ovinos Pelibuey. *Revista Electrónica de Veterinaria* 2012; 13 (7): 1-15.

20. Dunn A. Helminología veterinaria. 2ª ed. Ed Manual Moderno S.A. México D.F., 1983.
21. Encinas GR, Quiroz RH, Guerrero MC, Ochoa GP, Frecuencia de fasciolosis hepática e impacto económico en bovinos sacrificados en Ferrería, México, D.F. Vet. Méx. 1989; 20 (4): 423-426.
22. Euzéby J. Los parásitos de las carnes: epidemiología, fisiología, incidencias zoonosicas. Ed. Acribia, Zaragoza; España, 2000.
23. Ferreira J, Peaden P, Keiser J. *In vitro* trematocidal effects of crude alcoholic extracts of *Artemisia annua*, *A. absinthium*, *Asimina triloba* and *Fumaria officinalis*. Parasitol Res 2011; 109:1585-1592. DOI 10.1007/s00436-011-2418-0
24. Gallego BJ. Manual de parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. Universidad de Barcelona. Barcelona, España. 2007.
25. García RY. Etnobotánica de huertos familiares del Distrito de Putla, Oaxaca. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM, México D.F. 2010.
26. Georgi JR, Marion EG. Parasitology for veterinarians. 5ª ed. W.B. Saunders Company. U.S.A., 1990.
27. Hördegen P., Cabaret H., Hertzberg H., Langhans W., Maurer V. *In vitro* screening of six anthelmintic plant products against larval *Haemonchus contortus* with a modified methyl-thiazolyl-tetrazolium reduction assay. Journal of Ethnopharmacology 2006; 108: 85-89. DOI 10.1016/j.jep.2006.04.013
28. Hossain E, Chandra G, Nandy AP, Mandal SC, Gupta KJ. Anthelmintic effect of a methanol extract of leaves of *Dregea volubilis* on *Paramphistomum explanatum*. Parasitol Res 2012; 110: 809-814. DOI 10.1007/s00436-011-2558-2
29. Hoste H., Jackson F., Athanasiadou S., Thamsborg SM., Hoskin SO. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. Trends Parasitol. 2006; 22: 253-261.

30. Ibarra MS. Evaluación del efecto anti-fasciola con diversos extractos de algunas plantas mexicanas usadas en la medicina tradicional (Tesis de Doctorado en Ciencias Veterinarias). México, D.F., Universidad Nacional Autónoma de México, 2014.
31. Ibarra VF, Montenegro CN, Flores CJ, Hernández CA, Castillo BR. Evaluación de cuatro vehículos para formular un fasciolicida experimental. 1997. <http://www.ejournal.unam.mx/rvm/vol31-01/RVM31107.pdf>
32. Ibarra OF, Jenkins DC. An *in vitro* screen for new fasciolicidal agents. *Ztschrft Parasitenkd* 1984; 70: 655-661.
33. Ibarra VF, Figueroa CJA, Quiroz RH. Parasitología Veterinaria, volumen: II Helminthos. México: Ed. Color, S.A de C.V., 2011.
34. Nari A, Fiel C. Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos: bases epidemiológicas para su prevención y control. Ed. Hemisferio sur. México, D.F. 1988.
35. Olaechea FV. Epidemiología y control de *Fasciola hepatica* en Argentina. En: Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Ed. Hemisferio Sur, 1994.
36. Pineda CCA. Efecto antimicrobiano de *Psidium guajava* L. Contra *Salmonella typhimurium* en *Cavia porcellis* L. Tesis de Maestría. Lima Perú, 2013.
37. Quiroz RH. Epidemiología de la fasciolosis: Frecuencia en animales domésticos en México. En: Temas selectos de parasitología, 2000.
38. Quiroz RH. Parasitología y enfermedades parasitarias en animales domésticos. Ed. Limusa, México, 2005.
39. Ramírez A. Estudios biofarmacéuticos de alfaBIOF10 un nuevo agente fasciolicida (Tesis de Maestría en Ciencias). México D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México, 2007.
40. Rivera N, Ibarra F, Zepeda A, Fortoul T, Cantó G, Hernández A, Castillo R. The effect of the 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1H-benzimidazole

called compound alpha on the tegument of immature *Fasciola hepatica* in its natural host. Parasitology Research 2005; 95(1): 379-382.

41. Rodríguez S, Ordaz C, Avila G, Muñoz J, Arciniegas A, Romo A. In vitro evaluation of the amebicidal activity of *Buddleja cordata* (Longaniaceae, H.B.K) on several strains of *Acanthamoeba*. Journal of Ethnopharmacology. 1999; 66: 327-334.
42. Rojo VF. Fasciolosis. En: Parasitología veterinaria. Editores Cordero del Campillo y Rojo VF. Editorial McGraw-Hill Interamericana, 1999.
43. Sher H, Aldosari A, Ali A, J de Boer H. Economic benefits of high value medicinal plants to Pakistani communities: an analysis of current practice and potential. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine. 2014; 10: 1-16. <http://www.ethnobiomed.com/content/10/1/71>
44. Soulsby E.J.L. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 7ª ed., Ed. Interamericana, México, 1987.
45. Taylor EL. La fasciolosis y el Dístoma hepático. FAO: Estudios Agropecuarios. Roma, 1965.
46. Torres OL, Tapia PME, Aguilar CA. Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: farmacológico. Universidad de Barcelona. Barcelona, España. 2005.
47. Zahir AA, Rahuman AA, Bagavan A, Geetha K, Kamaraj C, Elango G. Evaluation of medicinal plant extracts and isolated compound epicatechin from *Ricinus communis* against *Paramphistomum cervi*. Parasitol Res 2012; 111: 1629-1635. DOI 10.1007/s00436-011-2589-8