



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MEXICO**

:

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**Efecto antihelmíntico de los extractos orgánicos
de la semilla de papaya (*Carica papaya*) *in vitro* e
in vivo sobre *Haemonchus contortus*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

**ELISA OROZCO ESPINOSA
LUCERO ITZEL HERNÁNDEZ GUERRERO**

**TUTORA PRINCIPAL:
DRA. ROSA ISABEL HIGUERA PIEDRAHITA**

**COASESORES:
M EN C JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
M EN C HÉCTOR ALEJANDRO DE LA CRUZ CRUZ**

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO., 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN



ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis.

Efecto antihelmíntico de los extractos orgánicos de la semilla de papaya (Carica papaya) in vitro e in vivo sobre Haemonchus contortus.

Que presenta la pasante: **Elisa Orozco Espinosa**
Con número de cuenta: **313345106** para obtener el título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de mayo de 2022.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M.V.Z. Gabriela Fuentes Cervantes	
VOCAL	Dra. María Guadalupe Prado Ochoa	
SECRETARIO	M. en C. Rosa Isabel Higuera Piedrahita	
1er. SUPLENTE	M.V.Z. EPOC Juan José Almazán Aldana	
2do. SUPLENTE	M.V.Z. Mario Alberto Viazcan Carbajal	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

MCVB/ntm*



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DEPARTAMENTO DE

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Efecto antihelmintico de los extractos orgánicos de la semilla de papaya (Carica papaya) in vitro e in vivo sobre Haemonchus contortus.

Que presenta la pasante: **Lucero Itzel Hernández Guerrero**
Con número de cuenta: **416002740** para obtener el título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de mayo de 2022.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M.V.Z. Gabriela Fuentes Cervantes	
VOCAL	Dra. María Guadalupe Prado Ochoa	
SECRETARIO	M. en C. Rosa Isabel Higuera Piedrahita	
1er. SUPLENTE	M.V.Z. EPOC Juan José Almazán Aldana	
2do. SUPLENTE	M.V.Z. Mario Alberto Viazcan Carbajal	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

MCVB/ntm*

Agradecimientos

Al proyecto PAPIIT IA204822: “Evaluación del efecto tóxico del extracto *n*-hexánico de *Artemisia cina* y cinaguaiacina sobre los parámetros bioquímicos en sangre y alteraciones anatomopatológicas en ratas Wistar después de su administración por vía oral”, que financió esta investigación.

Al proyecto COMECYT convocatoria EDOMEX-FICDTEM-2021-01 “Financiamiento para investigación de mujeres científicas” con el proyecto denominado: “Evaluación del efecto antihelmíntico de los metabolitos obtenidos a partir del extracto *n*-hexánico de *Artemisia cina* sobre fases de vida libre de *Haemonchus contortus*, que financió esta investigación.

Al proyecto PAPIIT IN226217: “Efecto antihelmíntico del extracto etanólico de *Artemisia cina*, semilla de papaya (*Carica papaya*) y taninos condensados sobre *Haemonchus contortus*”, que financió y apoyó esta investigación.

Al M.V. Daniel Fernando González Mendoza, catedrático y responsable del área de producción de ovinos de la Fundación Universitaria Juan de Castellanos por su colaboración y apoyo.

Al programa de movilidad estudiantil convenio específico de colaboración Interinstitucional entre la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán- UNAM y la Fundación Universitaria Juan de Castellanos” que hizo posible la colaboración para esta investigación entre ambas universidades y ambos países.

Dedicatorias

Elisa

Dedico este trabajo a todos aquellos que han creído en mí y me han apoyado: Culminar este proyecto no hubiera sido posible sin el apoyo profesional de nuestra asesora la Doctora Rosa Isabel Higuera Piedrahita, quien encausó nuestro camino y aprendizaje con dedicación y paciencia, confió en nuestra capacidad y entrega para realizar este proyecto y nos dio las herramientas necesarias para llevarlo a cabo, gracias por ser ese ejemplo de grandeza, empoderamiento y humildad.

Mamá y Papá, para ustedes quienes a pesar de mi carácter han sabido guiarme, corregirme y también dejarme ser yo, la tarea más difícil; gracias por enseñarme lo que el esfuerzo y dedicación pueden lograr, por no dejarme sola en este camino, porque se que gracias a su apoyo el viaje recorrido ha sido más tranquilo, y estoy muy orgullosa de poder decir que siempre he contado con ustedes incondicionalmente.

Hermanita mayor Judith, para ti y por ti, gracias por tu bello ejemplo de mujer, por tu cariño y protección, por ayudarme siempre con mis problemas técnicos aunque estuviera desesperada, Maestra en dirección de la comunicación Judith Orozco Espinosa, usted siempre ha sido mi maestra en la vida y estoy muy orgullosa de nosotras.

Familia Espinosa para ustedes, mi motor de vida de quienes he aprendido lo que la unión y el apoyo significan, en quienes encuentro confort, calidez y motivación siempre. Gracias por todos y cada uno de sus ejemplos de vida, porque si algo he aprendido de ustedes es el valor de la responsabilidad.

Abu Maty, una mención especial para ti, por ser mi mayor ejemplo de vida, porque tus enseñanzas de vida junto con las de mi abuelo Ezequiel han forjado una familia grande y fuerte con personas de bien, no podría estar más feliz y orgullosa de poder formar parte de ustedes y todo lo que crearon, por eso dedico esta parte de mi vida, este logro a ustedes.

A mis profesores en la universidad, de quienes no solo aprendí temas académicos si no también lecciones de vida, gracias por sus consejos, su conocimiento y dedicación, gracias por su entrega y vocación.

Profesores que sin duda alguna merecen mención, a ustedes quienes me enseñaron de manera didáctica lo bonito que es la medicina veterinaria, la ciencia y que personalmente su labor marco de manera positiva mi experiencia académica: Dra. Elizabeth Miranda Hernández y Dr. Fernando Carrillo (anatomía), Dra. Olivia Adams Vázquez (histología), Dra. María del Carmen Barrón García (genética), Dr. Juan Carlos del Río García (patología general), Dra. Hilda Sandoval Rivera (propedéutica clínica), Dr. Eduardo Palencia Silva (patología clínica), Dr. Carlos

Romero Basurto (zootecnia de bovinos productores de carne), Dr. Francisco Javier Carbajal Merchant (zootecnia canina y felina).

Dr. Enrique Flores Gasca (técnica quirúrgica), Dra. Patricia Mora Medina (inocuidad de los alimentos de origen pecuario) gracias a ambos por enseñar a hacer las cosas bien, y como se deben, por enseñar no sólo lo académico, sino a darle el respeto que se merece a nuestra profesión

Dr. Carlos Alfredo Ceciliano Romero clínica equina, Dra. Ana María Ríos Mena zootecnia equina, creo que los equinos tocan a las personas de una manera especial, ambos profesores no solo me enseñaron herramientas académicas, me dieron lecciones de vida, muchas gracias.

Para mis preciosas Lucero, Yara y Conce, por siempre apoyarnos en todos los sentidos, por fortalecernos mutuamente, se lo afortunada que soy de tener a mujeres como ustedes en mi vida, sumamente inteligentes, responsables, entregadas y sinceras. Lu gracias por aventurarte en este proyecto juntas, por ser mi amiga desde primer semestre hasta entonces, gracias por tu apoyo, tu paciencia y enseñanzas, eres una mujer de mente brillante y me enorgullece lo que hemos logrado entre las dos.

Para mi pequeño maestro peludo, Jagger, se que jamás te vas a enterar de esto porque ni leer sabes, pero gracias a ti es que he aprendido tanto, gracias por tu bella compañía.

A mi propio esfuerzo, porque a pesar del miedo y la adversidad encontré dentro de mí la determinación para concluir este gran paso.

Lucero

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme formar parte de una de las mejores universidades del mundo, por todas las herramientas disponibles para mi formación académica y profesional, por brindarme la oportunidad de poder aprender de maestros asombrosos y conocer personas maravillosas a mi paso por la facultad.

A mi mamá, María de la Luz Guerrero, la persona más importante para mí. Sin ella no estaría aquí ni sería lo que soy ahora. Te agradezco por todo el apoyo, el cariño y esfuerzo que has hecho y que me han permitido llegar hasta aquí. No me alcanzan las palabras para demostrarte lo agradecida que estoy. Te amo y te admiro mucho.

A mi hermana, Jazmín Hernández, por siempre estar para mí, por todo el apoyo que me has brindado y por todos los momentos juntas. Te quiero.

A mi abuelita, Eulalia Islas, por siempre alentarme y por no permitirme rendirme nunca, por todas sus palabras, por todo el amor y por inspirarme siempre a ser una mejor versión de mí. Gracias por ser una de mis primeras maestras de vida.

A mis perritos Pelusa, Mimi, Sullyvan, Toby, Dulce y Petunia por todas las noches en las que se quedaron acompañándome mientras hacía mis tareas, por inspirarme a ser una mejor profesional y darme fuerzas y motivación para seguir.

A mi compañera y amiga desde primer semestre, Elisa Orozco, por ser una de las mejores amigas que la vida me pudo poner en el camino. Gracias por todo tu apoyo en todo momento. Confío en que la vida nos permitirá seguir coincidiendo en cada una de nuestras etapas.

A Concepción Islas, mi incondicional. Gracias por ser la mejor amiga que alguien pueda tener, gracias por todo tu apoyo dentro y fuera de la carrera. Ha sido un placer coincidir contigo en esta vida. Ojalá lleguemos a los ochenta y sigamos siendo justo como hasta ahora.

A Yara Rueda, gracias por tu más sincera amistad, por todo tu apoyo, por todas las pláticas, las risas, los regaños, las salidas. Gracias por siempre estar. Te quiero

A Erick Romero Ramírez, gracias por todo tu apoyo durante este tiempo. Te agradezco por animarme siempre a luchar por mis sueños y por escucharme con interés cada que te platicaba acerca de algo que me impresionaba de mi carrera. Gracias por creer en mí.

Al M. en C. Héctor de la Cruz, por toda la ayuda brindada para cumplir mis metas y sueños. Gracias siempre por toda la amabilidad y el apoyo.

Agradezco muy especialmente a la Dra. Rosa Isabel Higuera Piedrahita. Por ser una de las mejores profesoras que pude tener, por preocuparse por el crecimiento académico de sus alumnos. Por ser una inspiración para mí y una de las mujeres que más admiro. Gracias por creer en Elisa y en mí y por todo su apoyo brindado durante estos casi seis años que tuve la fortuna de conocerla. Es un gran modelo a seguir no sólo como investigadora sino como persona. Gracias por tanto.

Contenido

Resumen	12
Abstract	14
Taxonomía del agente etiológico	17
Morfología	17
Estructuras superficiales	18
Ciclo biológico	19
Enfermedad por <i>Haemonchus contortus</i>	20
Hemoncosis	20
Epidemiología	21
Transmisión	22
Patogenia	22
Signos clínicos	23
Diagnóstico	23
Control	25
Resistencia parasitaria	25
Resistencia antihelmíntica	26
Alternativas de control	27
Herbolaria	27
<i>Carica papaya</i>	28
Taxonomía	28
Efecto antihelmíntico	28
Justificación	31
Hipótesis	32
Objetivos	33
Objetivo principal	33
Objetivos específicos	33
Capítulo I: Efecto antihelmíntico de la semilla de papaya (<i>Carica papaya</i>) sobre larvas infectantes de <i>Haemonchus contortus</i> .	34
Materiales y métodos	34
Localización	34

Diseño experimental	36
Identificación de los compuestos reportados en la semilla de papaya	36
Resultados	38
Discusión	42
Capítulo II: Efecto antihelmíntico de la semilla de papaya (<i>Carica papaya</i>) sobre larvas 4 hematófagas de <i>H. contortus</i> en jerbos (<i>Meriones unguiculatus</i>).	44
Materiales y métodos	44
Localización	44
Jerbos (<i>Meriones unguiculatus</i>)	44
Diseño experimental	44
Análisis de porcentaje de reducción	47
Resultados	47
Discusión	48
Capítulo III: Efecto del extracto en acetato de etilo de semilla de papaya (<i>Carica papaya</i>) sobre una infección natural de nematodos gastroentéricos en Tunja, Boyacá, Colombia.	50
Materiales y métodos	50
Localización	50
Unidades experimentales	50
Diseño experimental	50
Análisis estadístico	54
Resultados	54
Discusión	58
Discusión general	61
Conclusiones	65
Referencias bibliográficas	66

Índice de tablas

Tabla 1. Taxonomía (Taylor et. al., 2016)	17
Tabla 2. Antihelmínticos usados en el control tradicional de NGI (Cuéllar OJA, 2008).	25
Tabla 3. Diseño experimental para la evaluación de extractos de semilla de papaya (<i>Carica papaya</i>) sobre huevos y larvas	37
Tabla 4. Rendimiento de los extractos obtenidos a partir de la semilla de papaya (<i>Carica papaya</i>).	38
Tabla 5. Porcentaje de letalidad de las fracciones obtenidas a partir de semilla de papaya (<i>Carica papaya</i>) en L3 de <i>Haemonchus contortus</i>	41
Tabla 6. Diseño experimental para la evaluación de semilla de papaya sobre larva 4 en jerbos (<i>Meriones unguiculatus</i>)	44
Tabla 7. Porcentaje de reducción de larvas 4 en jerbos (<i>Meriones unguiculatus</i>) tratados con extractos orgánicos de semilla de papaya (<i>Carica papaya</i>).	47
Tabla 8. Porcentaje de reducción del número de huevos por gramo después del tratamiento de corderos infectados naturalmente con extracto en acetato de etilo de semilla de papaya (<i>Carica papaya</i>).	55

Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo biológico de <i>H. contortus</i> (Johnstone, 1998)	20
Figura 2. Edema submandibular (Rojo et al., 2017)	23
Figura 3. Escala gráfica de la coloración de la conjuntiva del ojo, método FAMACHA®	24
Figura 4. Extracción de extractos en rotaevaporador	35
Figura 5. Obtención de los extractos	35
Figura 6. Toma de muestra de materia fecal de ovino de la FES Cuautitlán	36
Figura 7. Placa ELISA para la evaluación in vitro del efecto letal de semilla de papaya sobre L3	37
Figura 8. Espectrometría de masas de bencil isotiocianato Sigma-Aldrich ®	39
Figura 9. Espectrometría de masas del extracto de acetato de etilo de semilla de papaya (<i>Carica papaya</i>)	40
Figura 10. Cronograma de la metodología utilizada para la obtención y evaluación de larvas 4 basada en la descrita por Squires et al., 2011	45
Figura 11. Administración de betametasona vía oral en jerbos	45
Figura 12. Botón de larvas concentradas y desvainadas en tubo eppendorf 1.5 mL	46
Figura 13. Raspado de la mucosa del estómago	47
Figura 14. Administración de levamisol en ovinos de la Fundación Universitaria Juan de Castellanos, Boyacá, Colombia	51
Figura 15. Toma de condición corporal de ovinos de la Fundación Universitaria Juan de Castellanos, Boyacá, Colombia	51
Figura 16. Muestras de microhematocrito en microcentrífuga	52
Figura 17 . Toma de muestra por venopunción en ovino de la Fundación Universitaria Juan de Castellanos, Boyacá, Colombia.	52
Figura 18. Conservación de muestras sanguíneas en tubos con etilendiaminotetracético (EDTA)	53
Figura 19. Observación al microscopio de huevos a través de una cámara McMaster	53
Figura 20. Larva observada al microscopio durante el examen	54
Figura 21. Efecto del extracto de acetato de etilo de semilla de papaya sobre la eliminación de huevos por gramo en corderos infectados naturalmente con nematodos gastroentéricos	55
Figura 22. Porcentajes de condición corporal entre grupos experimentales durante 28 días	56
Figura 23. Porcentajes de microhematocrito entre grupos experimentales durante 28 días	56
Figura 24. Porcentajes de coloración de la mucosa ocular entre grupos experimentales durante 28 días	57

Resumen

Las parasitosis del ganado son una de las principales causas que ocasionan grandes pérdidas económicas en todo el mundo. Uno de los parásitos mayormente implicado y que afecta principalmente a los pequeños rumiantes es *Haemonchus contortus*. El control tradicional contra los nematodos gastrointestinales se ha basado en mayor medida en fármacos sintéticos, su uso irracional e indiscriminado ha provocado que se genere resistencia por parte de los parásitos a estos fármacos lo que ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas ante esta problemática.

La presente investigación tuvo como principal objetivo determinar la actividad antihelmíntica de los extractos orgánicos (extracto hexánico, extracto metanólico y extracto de acetato de etilo) de la semilla de papaya (*Carica papaya*) *in vitro* sobre larvas 3 (L₃) de *Haemonchus contortus*, *in vivo* sobre larvas 4 (L₄) del mismo parásito, utilizando jerbos (*Meriones unguiculatus*) como modelo biológico infectados artificialmente y sobre helmintos de ovinos (*Ovis aries*) en pastoreo infectados naturalmente.

El estudio se dividió en tres fases experimentales. La primera fase consistió en la evaluación de los diferentes extractos de semilla de papaya *in vitro* sobre L₃ de *H. contortus*. Se elaboraron tres extractos orgánicos de semilla de papaya (*Carica papaya*), tomando en cuenta la polaridad de cada extracto se obtuvieron los siguientes extractos: extracto hexánico (no polar), extracto metanólico (polar) y extracto de acetato de etilo (polaridad neutra); En ellos se identificó el compuesto bencil isotiocianato (BITC) mediante espectrometría de masas, encontrando mayor presencia de dicho compuesto en el extracto de acetato de etilo, todos los extractos fueron desafiados contra L₃ previamente desenvainadas con hipoclorito de sodio utilizando placas de ELISA para los bioensayos, realizando tres repeticiones por cada extracto a distintas concentraciones (0.5, 1, 2 y 4 mg/mL), utilizando albendazol (7 mg/mL) como control positivo y agua destilada como control negativo, y se procedió a depositar 100 L₃ en cada pozo. Los extractos fueron evaluados a las 24 y 48 horas posteriores y se analizaron los resultados estadísticamente mediante un ANOVA con comparación de medias por prueba de Tukey. Los resultados demostraron que los tres extractos poseen actividad antihelmíntica contra *H. contortus*, sin embargo el extracto de acetato de etilo fue el que presentó una mayor actividad antihelmíntica obteniendo una letalidad del 35.33%, por lo cual se propone como el de mayor efectividad.

La segunda parte del presente estudio se basó en evaluar la actividad antihelmíntica de los extractos sobre L₄ de *H. contortus* utilizando como modelo biológico jerbos

(*Meriones unguiculatus*). Se utilizaron 25 jerbos divididos en cinco grupos (G1, G2, G3, G4, G5) para evaluar a los tres diferentes extractos y se utilizó un control negativo en el que se utilizó agua destilada y un grupo control positivo utilizando albendazol. Todos los grupos emplearon el mismo cronograma; Los jerbos fueron desparasitados el día uno, para posteriormente someterse a inmunosupresión al día ocho durante tres días seguidos utilizando Betametasona (0.05 mg/kg). La infección se efectuó al día 11 utilizando 10,000 L₃ previamente desvenadas para su posterior tratamiento al tercer día post-infección. El tratamiento por grupo fue el siguiente: extracto hexánico para el G1, extracto de acetato de etilo para el G2, extracto metanólico para el G3, el grupo control negativo y el grupo control positivo. Los animales fueron sacrificados el día 18 y se recuperaron las L₄ del estómago de los jerbos para su posterior cuantificación. Los resultados revelaron que el grupo sometido a tratamiento con extracto de acetato de etilo de semilla de papaya obtuvo la mayor actividad antihelmíntica al alcanzar un porcentaje de reducción del 60%, demostrando así que los extractos orgánicos de semilla de papaya poseen actividad antihelmíntica no sólo en estudios *in vitro* sino también *in vivo* y que utilizando jerbos como modelos biológicos se pueden alcanzar L₄ de una manera más rápida y económica en comparación con los ovinos.

En el último ensayo se evaluó la actividad antihelmíntica del extracto de acetato de etilo de semilla de papaya ovinos en pastoreo (*Ovis aries*) con una infección natural sobre helmintos de dicha especie, debido a que éste extracto demostró mayor efectividad en las primeras dos fases de la investigación anteriormente descritas. Este estudio fue realizado en Tunja, Boyacá, Colombia. Se utilizaron veinticuatro ovinos de raza criolla de distintas edades en sistema de pastoreo, todos positivos a nemátodos gastroentéricos y sin desparasitaciones previas, los cuales se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos: grupo uno tratado con extracto de acetato de etilo (8 mg/kg PO), administrando una sola dosis al día uno, grupo dos se trató con levamisol (7.5 mg/kg SC) una sola aplicación al día uno, el grupo tres control negativo, no recibió tratamiento. Las variables de estudio fueron: la cantidad de huevos por gramo (HPG), la coloración de las mucosas mediante el método FAMACHA®, la condición corporal y el hematocrito; Los datos se tomaron previo al tratamiento y a los siete, 14 y 28 días posteriores. Los resultados evidenciaron que el grupo que fue tratado con el extracto de acetato de etilo obtuvo un porcentaje de reducción de HPG del 69.81% al día siete, para posteriormente descender a los días 14 y 21 (60.60% y 23.64% respectivamente), en cambio en el grupo tratado con levamisol al día siete obtuvo un porcentaje de reducción del 29.69%, el cual fue aumentando en los días posteriores a 57.01% para el día 14 y a 84.06% para el día 28. Los resultados indican que el extracto de acetato de etilo de semilla de papaya posee actividad antihelmíntica contra helmintos de ovinos infectados naturalmente, sin embargo, este extracto tiene un efecto inmediato más no un efecto residual.

Abstract

The livestock parasitosis is one of the main causes that cause great economic losses around the world. One of the parasites most involved and that mainly affects small ruminants is *Haemonchus contortus*. Traditional control against gastrointestinal nematodes has been based mostly on synthetic drugs; its irrational and indiscriminate use has caused resistance to these drugs by parasites, leading to the search for new alternatives to this problem.

The present research had as main aim to determine the anthelmintic activity of organic extracts (hexanic extract, methanol extract and ethyl acetate extract) of papaya seeds (*Carica papaya*) *in vitro* on larvae 3 (L₃) of *Haemonchus contortus*, *in vivo* on larvae 4 (L₄) from the same parasite, using gerbils (*Meriones unguiculatus*) as a biological model artificially infected and on grazing sheep helminths (*Ovis aries*) naturally infected.

The study was divided into three experimental phases. The first phase consisted in the evaluation of the different extracts of papaya seeds *in vitro* on L₃ of *H. contortus*. Three organic extracts of papaya seeds (*Carica papaya*) was elaborated, considering the polarity of each extract were obtained the next extracts: hexanic extract (no polar), methanolic extract (polar) and ethyl acetate extract (neutral polarity); In them the compound benzyl isothiocyanate (BITC) was identified through mass spectrophotometry, finding more presence of this compound on the ethyl acetate extract, all of extracts were challenged against L₃ previously exsheathment with sodium hypochlorite using ELISA plates for bioassays, doing three repetitions for each extract to different concentrations (0.5, 1, 2 and 4 mg/mL), using albendazole (7 mg/mL) as a positive control and distilled water as a negative control, and proceeded to deposit 100 L₃ in each well. The extracts were evaluated at 24 and 48 hours later and the results was statistically analyzed through an ANOVA with comparison of means by Tukey's test. The results demonstrated that three extracts have anthelmintic activity against *H. contortus*, nevertheless the ethyl acetate extract was the one that presented the greatest anthelmintic activity obtaining a lethality to 35.33%, for this reason it is proposed as the greatest effectiveness.

The second part of the present study was based on evaluating the anthelmintic activity of the extracts on L₄ of *H. contortus* using gerbils (*Meriones unguiculatus*) as a biological model. 25 gerbils were divided in 5 groups (G1, G2, G3, G4 and G5) to evaluate the three different extracts and it was used as a negative control using distilled water and a positive control using albendazole. All the groups employed the same cronogram; the gerbils were dewormed the first day, for later to undergo

immunosuppression on day eight for three consecutive days using Betamethasone (0.05 mg/kg). The infection was carried out on day 11 using 10,000 L₃ previously exsheathed for further treatment on the third day post-infection. The treatment per group was as follows: hexanic extract for the G1, ethyl acetate extract for the G2, methanol extract for G3, the negative control and the positive control. The animals were slaughtered on day 18 and L₄ were recovered from the gerbils stomach for the next quantification. The results revealed that the group of ethyl acetate extract of papaya seeds got the greatest anthelmintic activity upon reaching a reduction percentage of 60% thus proving that the organic extracts of papaya seeds have anthelmintic activity not only in studies *in vitro* but also in *in vivo* studies and that using gerbils as a biological model than can be achieved L₄ in a faster and cheaper way compared to sheep.

In the last assay the anthelmintic activity of the ethyl acetate extract of papaya seeds in grazing sheep (*Ovis aries*) with a natural infection was evaluated against helminths of that species, because this extract showed greater effectiveness in the early experimental phases. This study was done in Tunja, Boyacá, Colombia. Twenty four creole breed sheep of different ages in grazing system was using, all of them positive to gastroenteric nematodes and without previous deworming, which were randomly distributed in three groups: group 1 treated with ethyl acetate extract (8 mg/kg PO), giving a single dose on day 1, group 2 was treated with levamisole (7.5 mg/kg SC) one application on day one, group 3 negative control did not receive any treatment. The study variables were: the number of eggs per gram (EPG), the coloration of the mucosa using the FAMACHA© method, the body condition and the hematocrit; the data were taken previous to treatment and on days seven, 14 and 28 after the treatment. The results showed that the group treated with ethyl acetate extract obtained a EPG reduction percentage of 69.81% on day seven, to later descend on days 14 and 28 (60.60% and 23.64% respectively), instead the group treated with levamisole on day seven obtained a reduction percentage of 29.69%, which was increasing the next days to 57.01% on day 14 and to 84.06% on day 28. The results indicated that the ethyl acetate extract of papaya seeds has anthelmintic activity against sheep helminths naturally infected, nevertheless this extract has an immediate effect but hasn't a residual effect.

Introducción

Las parasitosis del ganado causan grandes pérdidas significativas alrededor del mundo (Comans-Pérez *et al.*, 2020). La helmintiasis constituye una de las principales causas de pérdidas económicas y una restricción considerable para la salud de los ovinos (Aderibigbe *et al.*, 2020). Dentro de los de mayor incidencia *Haemonchus contortus* es el que mayor pérdida ocasiona en las producciones ovinas, dada su característica hematófaga, ya que induce emaciación, anemia y en casos agudos hasta la muerte (Cardona *et al.*, 2017, Comans-Pérez *et al.*, 2020).

Las enfermedades por nematodos gastrointestinales (NGI) son un problema común en los animales en pastoreo. Los animales ingieren el estadio larvario 3 (L₃) el cual se encuentra en las hojas de la pradera (Comans-Pérez *et al.*, 2020).

Nematodos gastrointestinales

El phylum nematoda, es comúnmente conocido como gusanos redondos o “lombrices” por su forma cilíndrica no segmentada y por la presencia de una capa translúcida que recubre su cuerpo conocida como cutícula (Taylor, 2016), los nematodos gastrointestinales causan grandes pérdidas económicas y se consideran el factor limitante más importante en las producciones ovinas alrededor del mundo (Ahmed *et al.*, 2012).

Probablemente existan más de 1 millón de especies de nematodos, pero solo unas 25,000 han sido descritas, de estas sólo el 15% parasitan animales (Lucius *et al.*, 2017).

Dentro de los nematodos gastrointestinales más comunes de los pequeños rumiantes se encuentran: *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus axei*, especies de *Nematodirus* y de *Cooperia* (Padilla, 2020).

Generalidades

El también llamado “gusano rojo del estómago” o gusano de palo de barbería, es un parásito principalmente de pequeños rumiantes, poco común en bovinos y que afecta también a ciervos, camellos y llamas. Es un parásito fácil de identificar gracias su localización en abomaso y a su gran tamaño (2-3 cm) (Taylor *et al.*, 2016)

Se ha sugerido que no existe ningún rebaño completamente libre de este parásito. Es una de las varias especies, que, en rumiantes domésticos, ocasiona gastroenteritis parasitaria (Lucius *et al.*, 2017).

Haemonchus contortus se ha encontrado con mayor prevalencia en climas tropicales y subtropicales y ha sido capaz de adaptarse a diferentes climas como el templado (Escribano, 2019; Padilla, 2020). Se considera como un parásito facultativo, es decir, que combina ciclos de vida libre con ciclos alternados en el hospedador, por lo cual se le considera como el nematodo gastrointestinal con mayor prevalencia en México (Garduño *et al.*, 2012).

Taxonomía del agente etiológico

Tabla 1. Taxonomía (Taylor *et al.*, 2016)

Reino	Animalia
Phylum	Nematoda
Clase	Secernentea
Orden	Strongylida
Suborden	Strongylina
Superfamilia	Trichostrongyloidea
Familia	Trichostrongylidae
Subfamilia	Haemonchinae
Género	<i>Haemonchus</i>
Especie	<i>Contortus</i>

A pesar de que se considera en dicha familia, se considera por separado ya que los procesos patológicos que provoca son más complejos (Radostits *et al.*, 2006).

Morfología

Dimorfismo sexual

Como todos los nematodos, *H. contortus* presenta dimorfismo sexual, el cual se hace evidente principalmente en el tamaño; estos helmintos llegan a medir entre 10 y 30 mm (Cardona *et al.*, 2017), Las hembras (20-30 mm) son más largas que los machos (10-22 mm) (Lucius *et al.*, 2017, Taylor 2016). El macho tiene un lóbulo dorsal asimétrico y espículas con púas; la hembra suele tener un colgajo vulvar prominente (Taylor *et al.*, 2016).

En las hembras, la vulva se localiza en el cuarto posterior del cuerpo, pudiendo encontrarse expuesta o cubierta por un proceso lingüiforme, el cual puede variar en su tamaño. Los ovarios se encuentran en espiral alrededor del intestino, lo que resulta en su característica semejanza al palo de barbería (De Jesús *et al.*, 2015, Taylor *et al.*, 2016, Lucius *et al.*, 2017)

La cola de los machos contiene estructuras accesorias, que son útiles tanto en la cópula como para su identificación (Jacobs *et al.*, 2016). Cuentan con dos espículas relativamente cortas que miden 490–540 µm con una púa o lengüeta en el extremo distal, las cuales participan en la transferencia de esperma durante la cópula (Jacobs *et al.*, 2016, Lucius *et al.*, 2017, De Jesús *et al.*, 2015)

Estructuras superficiales

La cutícula que cubre la superficie es una estructura compleja rica en colágeno, con puntos de referencia microscópicos, como pequeños hoyos que contienen diminutos dedos llamados papilas sensoriales (Jacobs *et al.*, 2016). Esta es secretada por la hipodermis subyacente, la cual se proyecta hacia la cavidad corporal formando dos cordones laterales, que llevan los canales excretores, un cordón dorsal y ventral que lleva los nervios (Taylor, 2016).

Las células musculares se encuentran dispuestas longitudinalmente, y se localizan entre la hipodermis y la cavidad corporal. Este último contiene fluido a alta presión, que mantiene la turgencia y la forma del cuerpo (pseudoceloma). La locomoción se efectúa ondulando ondas de contracción y relajación muscular que se alternan en el aspecto dorsal y ventral del gusano (Jacobs *et al.*, 2016).

Sistema digestivo.

El sistema digestivo de los NGI puede dividirse en tres partes:

1. La abertura oral y la faringe (a veces llamada esófago), ambas estructuras se encuentran revestidas con cutícula y, por lo tanto, sujetas a muda.
2. El intestino endodérmico.
3. El recto (revestido de cutícula) (Lucius *et al.*, 2017)

La abertura oral, es pequeña y contiene un “diente pequeño” denominado lanceta, el cual es utilizado para succionar la sangre de su hospedero (Jacobs *et al.*, 2016, Taylor *et al.*, 2016).

El esófago es un órgano muscular, que se encarga de “bombear” la sangre ingerida al intestino, debido a que, las fuerzas internas producidas por los fluidos a alta presión que mantienen el pseudoceloma dificultan la deglución, por tal motivo, para evitar la regurgitación también cuenta con una válvula en su extremo distal (Lucius *et al.*, 2017, De Jesús *et al.*, 2015, Jacobs *et al.*, 2016, Taylor *et al.*, 2016).

El intestino se presenta como un tubo de células epiteliales, su lumen se encuentra revestido con un borde en cepillo de microvellosidades. El recto del macho recibe de los testículos y expulsa el espermatozoos, por lo que se considera una cloaca (Lucius *et al.*, 2017).

Ciclo biológico

El ciclo biológico de *H. contortus* (Figura 1) es directo y tiene dos fases una exógena y una endógena (Aguilar-Caballero *et al.*, 2011). El ciclo comienza en el ovino infectado (hospedador definitivo) el cual elimina huevos a través de la materia fecal iniciando así la fase exógena, estos huevos con las condiciones adecuadas de temperatura y de humedad eclosionan y al entrar en contacto con el oxígeno dan lugar a la larva 1 (L₁) que posteriormente muda a larva 2 (L₂) hasta alcanzar su estadio infectante que es la larva 3 (L₃). Este proceso puede durar desde 5 días o incluso puede retrasarse semanas o meses si las condiciones no son favorables. (Taylor *et al.*, 2016). Las L₃ se consideran la fase más resistente y estas larvas se ubican dentro de los primeros 5 cm de la pastura para poder ser ingeridas por los ovinos. La fase endógena inicia una vez que las larvas son ingeridas por el hospedador y son desvainadas en el rumen debido al incremento del pH ruminal por la acción de la enzima leucino-aminopeptidasa a través de las células neurosecretoras de la larva (Aguilar- Caballero *et al.*, 2011). Estas llegan al abomaso mudando a larva 4 (L₄) en uno o dos días, donde penetran las criptas de las glándulas gástricas y desarrollan la lanceta perforadora para alimentarse y crecer, ahí permanecen de 10 a 14 días. Es importante mencionar que las larvas durante este proceso pueden detener su desarrollo cuando las condiciones no son favorables, entrando así en hipobiosis (Aguilar-Caballero *et al.*, 2011). Posteriormente, llegan al lumen del abomaso donde mudan a larva 5 (L₅) hasta madurar y formar a los adultos machos y hembras (Quiroz *et al.*, 2014; Taylor *et al.*, 2016; Mendes *et al.*, 2020). Tras la oviposición los adultos liberan una gran cantidad de huevos al medio externo alrededor de los días 21 y 28 post infección, iniciando así un nuevo ciclo (Aguilar *et al.*, 2008).

Su periodo de prepatencia es de 2 a 3 semanas en ovinos (Taylor *et al.*, 2016).

Haemonchus - Ciclo de vida

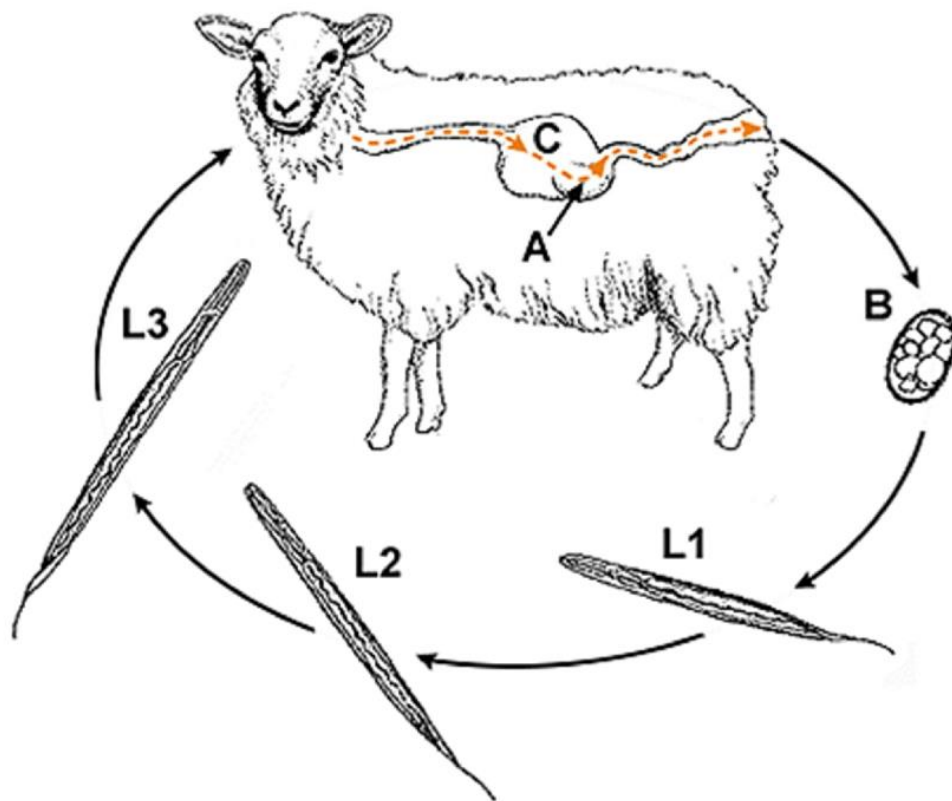


Figura 1. Ciclo biológico de *H. contortus*. A: Ubicación del adulto. B: Huevo tipo estróngilo. C: L3 desenvaina en el rumen (Johnstone, 1998)

Enfermedad por *Haemonchus contortus*

Hemoncosis

La hemoncosis es una enfermedad causada por el parásito helminto *Haemonchus contortus*, también conocido como “gusano rojo del cuajar” y se localiza en la mucosa del abomaso (Cardona *et al.*, 2017). Afecta a bovinos, ovinos, caprinos y rumiantes en general, *Haemonchus contortus* es considerado el parásito gastrointestinal más patógeno de los pequeños rumiantes que ocasiona grandes pérdidas económicas (Escribano, 2019).

Epidemiología

Haemonchus contortus es un parásito cosmopolita y se encuentra casi en todas las regiones ganaderas.

El parásito se ve afectado por varios factores, entre ellos los ambientales, del hospedador y del propio parásito, como se muestra a continuación:

Factores ambientales

Pastoreo. La producción de manera extensiva de los animales en donde prevalezca un manejo inadecuado de las praderas, donde no se realice la separación de lotes por edades y exista la presencia de animales enfermos constituye un importante vehículo de transmisión para esta parasitosis (Mendes *et al.*, 2020).

Humedad. La humedad favorece el desarrollo de las fases infectantes (L₃). La precipitación pluvial por arriba de los 50 mm mensuales facilita la transmisión de la mayoría de los nematodos, los sistemas silvopastoriles proporcionan sombra a la pradera pudiendo evitar la desecación de huevos y larvas y creando las condiciones ideales para la sobrevivencia de las fases infectantes. Pasturas con riego influyen en la disponibilidad de L₃ (Mendes *et al.*, 2020).

Factores del hospedador

Especie. Dentro de las especies a las que afecta este nematodo se encuentran los bovinos, ovinos y caprinos. Siendo los pequeños rumiantes los más afectados debido a su manera de obtener los alimentos, los caprinos tienden al ramoneo mientras que los ovinos suelen ser selectivos al escoger su alimento, ya que prefieren la pastura húmeda, predisponiéndolos a obtener una gran cantidad de larvas infectantes (Moya *et al.*, 2014).

Edad. Los animales principalmente afectados por la hemoncosis suelen ser los jóvenes menores de un año debido a que su sistema inmune es inmaduro (Moya *et al.*, 2014) y no han estado expuestos a infecciones anteriormente (Mendes *et al.*, 2020).

Sexo. Se ha observado que en los animales jóvenes afecta tanto a hembras como machos mientras que en animales adultos las hembras suelen ser más afectadas que los machos, esto debido a que durante la gestación y la lactancia se presenta inmunosupresión provocada por la prolactina lo que genera un alza postparto, alza lactacional y un alza periparto y son estas las que eliminan la mayor cantidad de huevos que infectan a sus crías y otros animales susceptibles (Moya *et al.*, 2014; Padilla, 2020).

Raza. Las razas nativas y criollas suelen presentar una mayor resistencia a los parásitos ya que han tenido contacto con ellos, caso contrario a lo que sucede con las razas exóticas y/o puras que no han tenido contacto con el parásito.

Estado nutricional. Se ha observado que los animales con un buen estado nutricional pueden parasitarse, sin embargo, no suelen presentar la enfermedad, encontrando animales resilientes, caso contrario a lo que ocurre con los animales que presentan malnutrición o desnutrición, los cuales suelen presentar una alta carga parasitaria y suelen ser los más afectados (Moya *et al.*, 2014).

Factores del parásito

El ciclo biológico juega un factor importante dado que la fase infectante presenta características que permiten favorecer la permanencia del parásito en la pradera como el hidrotropismo positivo, geotropismo negativo, fototropismo positivo (a la luz tenue).

Transmisión

La transmisión de este parásito es por vía oral y ocurre al ingerir a la fase infectante que es el estadio L₃ presente en praderas contaminadas.

Patogenia

La acción expoliatriz del parásito, específicamente su acción hematófaga a nivel del abomaso causada inicialmente por la L₃ y posteriormente por las L₄ y L₅ ocasiona pérdidas sanguíneas, asociado a esto, el parásito produce una sustancia anticoagulante la cual impide la hemostasia de los capilares generando así que continúe la pérdida de sangre posterior a la alimentación del nematodo (Escribano, 2019). La pérdida de sangre puede ascender a 50 µl por gusano por día, provocando de esta manera anemias hemorrágicas que pueden manifestarse en el hospedador antes de detectar la presencia de huevos en la materia fecal, los cuales van a depender de la carga parasitaria del animal (Lucius *et al.*, 2017; Escribano, 2019). La inflamación consecuente de su acción expoliatriz, conduce a la indigestión y disminución de la ingesta de alimentos (Lucius *et al.*, 2017).

Las células glandulares productoras de ácido en el abomaso del hospedador son destruidas por la L₄ durante la fase histotrófica e hipobiótica, causando consecuentemente un pH elevado, se disminuye la conversión de pepsinógeno a pepsina, alterando la digestión proteica, provocando un aumento en el crecimiento de bacterias (Lucius *et al.*, 2017).

Signos clínicos

Dentro de los signos clínicos más evidentes se incluye pérdida de peso, pobre ganancia de peso y una disminución en el rendimiento reproductivo (Mendes *et al.*, 2020).

Los animales con hemoncosis pueden presentar tres cuadros clínicos: hiperagudo, agudo y crónico. El primero se caracteriza por una muerte repentina en los animales afectados, en el segundo se presenta debilidad y palidez en las mucosas, pérdida de peso, diarrea, pelo hirsuto, deshidratación y edema submandibular (Figura 2), este curso es el más común en los animales jóvenes y el tercero presenta pérdidas en la ganancia de peso, así como un menor rendimiento en las tasa de crecimiento, generalmente este último cuadro ocurre en animales adultos (Cardona *et al.*, 2017; Mendes *et al.*, 2020).



Figura 2. Edema submandibular (Rojo *et al.*, 2017)

Diagnóstico

El diagnóstico se realiza a través de la evaluación microscópica por medio de técnicas coproparasitológicas en donde se busca la presencia de huevos de nemátodos, los cuales se pueden contabilizar en huevos por gramo (HPG) de materia fecal mediante la técnica de McMaster, sumado a signos clínicos evidentes como mucosas pálidas, edema, disminución de la condición corporal, diarrea y en los casos extremos la muerte. En este caso, los hallazgos encontrados en la necropsia corresponden a los cuadros anémicos ocasionados por las hemorragias, se observa también decoloración en los tejidos y edemas, expansión de médula ósea y lesiones abomasales causadas por la acción patogénica del parásito, junto con un contenido pardo y diversas cantidades de parásitos (Quiroz, 1994; Aguilar-

Caballero, 2011). Así mismo, se observa necrosis en el tracto gastrointestinal (Moya *et al.*, 2014).

Otra técnica reportada utilizada comúnmente es el método FAMACHA® (Figura 3) el cual consiste en revisar la coloración de las mucosas en el área del tercer párpado y realizar una evaluación de esta para determinar el grado de anemia en una escala del uno al cinco, siendo el uno el color rojo más brillante y el cinco el color rojo más pálido casi blanco (Mendes *et al.*, 2020).

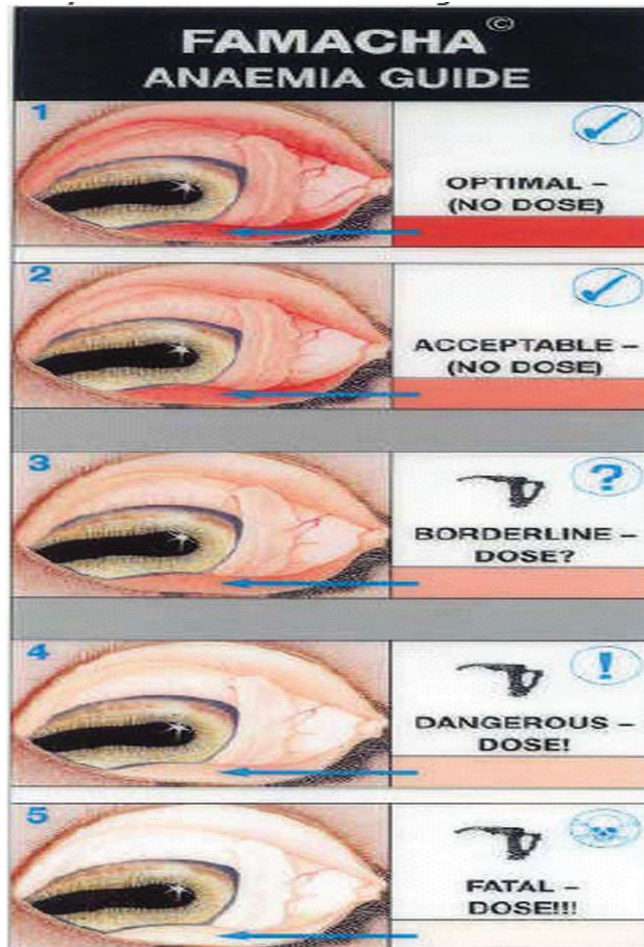


Figura 3. Escala gráfica de la coloración de la conjuntiva del ojo, método FAMACHA®.

Control

El control se ha basado principalmente en el uso de antihelmínticos sintéticos sin embargo el uso inadecuado de estos fármacos ha provocado que se genere una alta resistencia por parte de los parásitos, aunado a esto existe la posibilidad de provocar desequilibrios ambientales y presentar residuos tóxicos en la carne, la leche y la lana (Sagüés *et al.*, 2011).

Tabla 2. Antihelmínticos usados en el control tradicional de NGI (Cuéllar OJA, 2008).

Grupo	Principio activo	Dosis mg/kg	Vía de administración
Benzimidazoles	Tiabendazol	44	Oral
	Albendazol	5	Oral
	Febendazol	5	Oral
	Oxfendazol	5	Oral
Probencimidazoles	Febantel	6	Oral
	Tiofanato	50	Oral
	Netobimín	7.5	Oral
imidazotiazoles	Levamisol	7.5	Subcutánea
Lactonas Macrocíclicas	Ivermectina	0.2	Subcutánea y oral
	Moxiditina	0.2	Subcutánea
	Doramectina	0.2	Subcutánea
Nitrofeonoles	Nitroxinil	10	Subcutánea
Salicilanilidas	Closantel	10	Subcutánea y oral

Los benzimidazoles y las lactonas macrocíclicas han sido eficaces en el tratamiento de esta parasitosis durante décadas (Tabla 2), sin embargo, están perdiendo su eficacia debido al desarrollo de resistencia (Lucius *et al.*, 2017).

Resistencia parasitaria

La resistencia se describe como la capacidad de los animales para controlar sus poblaciones parasitarias mientras que la resiliencia puede definirse como la capacidad de los animales para mantenerse productivos aun estando parasitados (Aguilar *et al.*, 2008).

Los nematodos pueden emplear una variedad de estrategias diferentes para lograr un estado de susceptibilidad reducida a un medicamento antihelmíntico en particular, entre estas se encuentran:

- La modificación del sitio de acción del fármaco.
- El aumento del número de sitios de acción.
- El aumento de excreción del fármaco.

- El aumento en el metabolismo del fármaco y/o secuestro del fármaco (Gasser *et al.*, 2016).

Resistencia antihelmíntica

En México y Colombia los ovinocultores tienen la costumbre de tratar a su ganado con fármacos sintéticos, sin embargo, el uso desmedido e irracional de antihelmínticos como forma de control de nematodos gastrointestinales ha llevado a una generación de parásitos resistentes (Bihaqui, *et al.*, 2020; Domínguez, 2018; Rodríguez *et al.*, 2020). Problemas como la sobredosificación, la mala elección del fármaco, la falta de diagnósticos clínicos y estudios de laboratorio que verifiquen la parasitosis y el tipo de parásito, así como programas para verificar la eficacia de los antiparasitarios ha llevado a la aplicación de los mismos antiparasitarios y con ello a un aumento en la resistencia antihelmíntica. En México, específicamente en el Valle del Mezquital los ovinocultores carecen de métodos y estrategias para el control y la prevención del parasitismo llevando a la aplicación de antihelmínticos de manera terapéutica exclusivamente. Una cuarta parte de los ovinocultores entrevistados desconocen de métodos antiparasitarios y por ende no los llevan a la práctica, reflejando así altas tasas de mortalidad y bajas en el rendimiento productivo (Domínguez, 2018).

En Colombia la información respecto a la resistencia antihelmíntica es escasa debido a que la investigación en esta área es insuficiente y a la falta de informes publicados (Torres *et al.*, 2012; Chaparro *et al.*, 2012).

La resistencia antihelmíntica se presenta con una gran cantidad de fármacos, los residuos químicos y la toxicidad también se presentan (Islam *et al.*, 2019). Estos químicos se consideran sustancias residuales en la carne que pueden ser dañinas para el consumidor (Rodríguez *et al.*, 2018).

La resistencia hacia los benzimidazoles, está dada por un mecanismo de modificación del sitio de acción de este fármaco por parte del nematodo, en el cual existe una variación en la secuencia del gen de la β - tubulina, un cambio en su secuencia de aminoácidos en el codón 200 de TTC200 a TAC200, hace que se exprese tirosina en lugar de fenilalanina, reduciendo la afinidad de unión considerablemente, sin embargo además de esta mutación, han ido incrementándose las mutaciones relacionadas con la resistencia a este fármaco (Gasser *et al.*, 2016).

Del mismo modo, la resistencia al levamisol está dada por el mismo mecanismo de resistencia que los benzimidazoles, ya que existen cambios en las subunidades del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), así como en proteínas auxiliares, implicadas en el ensamblaje del receptor y subunidades receptoras (Gasser *et al.*, 2016, Sarai *et al.*, 2014).

Los nematodos parásitos poseen una gran variedad de enzimas metabolizantes inducibles y transportadores para protegerse contra las toxinas. Existen tres reacciones principales de desintoxicación en los nematodos, la modificación, conjugación y excreción de compuestos tóxicos. Las CYP450 y las deshidrogenasas/reductasas de cadena corta están involucradas en la modificación; las UDP-glucuronosiltransferasas (UGT) y las glutatión S-transferasas (GST) están implicadas en la conjugación; y los transportadores del casete de unión a ATP (ABC) en la excreción. Se asume que estos sistemas de desintoxicación también están involucrados en la desintoxicación de antihelmínticos o resistencia de antihelmínticos (Gasser *et al.*, 2016).

Alternativas de control

Actualmente, se han desarrollado nuevas alternativas de control para el parasitismo gastrointestinal las cuales presentan distintos grados de eficacia y han llevado a una disminución en el uso de fármacos sintéticos (Domínguez, 2018). Dentro de estas alternativas se encuentran la resistencia genética, inmunológica y nutricional de los animales, la administración de vegetales antihelmínticos, los nutracéuticos, el control biológico (hongos nematófagos), la rotación de praderas, la inmunización con larvas y vacunas, el pastoreo simultáneo con bovinos, las agujas de cobre, la desparasitación selectiva con el método FAMACHA®, la rotación de los antihelmínticos y el control integrado de parásitos (Sagüés *et al.*, 2011; Domínguez, 2018; Torres-Acosta *et al.*, 2012). Esta última alternativa permite utilizar mecanismos para reducir la carga parasitaria y seleccionar animales resilientes y resistentes (Cuéllar, 2007). Dentro de estas alternativas se encuentran las plantas medicinales las cuales pueden mantener bajos umbrales de parásitos gastrointestinales lo que se traduce en bajas pérdidas económicas y son más amigables con el medio ambiente (Moya *et al.*, 2014).

Herbolaria

Estudios han demostrado que gran variedad de plantas que son usadas en la práctica etnoveterinaria presentan una gran actividad antihelmíntica las cuales podrían ser de ayuda dentro de la práctica veterinaria (Islam *et al.*, 2019).

Uno de los grupos con potencial antihelmíntico reportado son las cisteínproteínas las cuales se encuentran en frutos como los higos, kiwis, piñas y papayas (Buttle *et al.*, 2011).

Carica papaya

La papaya (*Carica papaya*) es un fruto que se obtiene todo el año y se cultiva en regiones tropicales y subtropicales y es bien conocido por sus beneficios nutricionales y aplicaciones en la medicina (Navarro *et al.*, 2016; Ameen *et al.*, 2018). El fruto maduro contiene abundantes semillas semiesféricas con una coloración grisácea a negra, de 5 mm de diámetro (Gil y Miranda, 2008). Las semillas de papaya contienen ácidos grasos, proteína cruda, fibra cruda, aceite de papaya, carpaina, benzil isotiocianato, bencilglucosinolato, glucotropacolin, benziltiourea, hentriacontano, beta-sitosterol, caricina y enzima miosinasa. (Krishna *et al.*, 2008).

Un remedio utilizado para la expulsión de parásitos humanos consiste en pulverizar las semillas secas y mezclarlas con miel de abeja para administrar una cucharada en ayunas durante dos a tres días con la finalidad de expulsar a los nematodos el cual no ha mostrado efectos secundarios (Chomba-Angeles *et al.*, 2014; Zingare *et al.*, 2018). Es importante considerar los efectos secundarios que pudieran presentar las plantas medicinales y sus principios activos ya que en algunos casos pueden opacar los efectos terapéuticos (Moya *et al.*, 2014).

Taxonomía

Según Berlinjn (1990), la papaya tiene la siguiente clasificación taxonómica:

- Familia: Caricáceas
- Género: *Carica*
- Especie: papaya
- Nombre científico : *Carica papaya* L.

Efecto antihelmíntico

La papaya (*Carica papaya*) contiene grandes compuestos activos tales como las cisteín proteínasas dentro de las que se encuentran la quimopapaína y papaína las cuales han demostrado potencial antihelmíntico (Moraes *et al.*, 2016). El mecanismo de las cisteín proteínasas por el cual se disminuye la motilidad larvaria de los nematodos se atribuye al deterioro y a la degradación de la cutícula del parásito por la acción catalítica de la papaína en los enlaces disulfuro (Moraes *et al.*, 2016). La

papaína es un fermento digestivo proteolítico y componente enzimático el cual se encarga de disolver la quitina o queratina que recubre el cuerpo de los helmintos para posibilitar la expulsión de los parásitos del intestino (Islam *et al.*, 2019; Chomba-Angeles *et al.*, 2014). La papaína se encuentra en varias partes de la planta, entre ellas, en las hojas, en el fruto inmaduro y las semillas (Chomba-Angeles *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que el látex de papaya contiene grandes concentraciones de cisteínproteinasas, sin embargo, algunos estudios han reportado que esta parte de la planta no tiene eficacia contra *H. contortus* en ovejas y es altamente tóxico en rumiantes (Buttle *et al.*, 2011).

Estudios han demostrado que las semillas de papaya, las cuales constituyen entre 12 y 22% de producto de desecho del fruto, mezcladas con agua o con solventes orgánicos, dan como resultado extractos crudos los cuales presentan actividad antihelmíntica y contienen compuestos activos como el bencil isotiocianato (BITC) (Kermanshai *et al.*, 2001; Navarro *et al.*, 2016).

El bencil isotiocianato es el compuesto con mayor actividad antihelmíntica presente en las semillas (Moraes *et al.*, 2016). El BITC se produce del benzyl glucosinolato. Los glucosinolatos son metabolizados para producir isotiocianatos gracias a la acción de las enzimas llamadas mirosinasas. Las mirosinasas y los glucosinolatos se encuentran en diferentes compartimentos dentro de la semilla, en la endoesperma y en la sarcotesta respectivamente, aunque una pequeña fracción de sustrato y de enzima residen juntas en el embrión. Es debido a esto que las semillas de papaya deben de ser maceradas para producir grandes cantidades de BITC (Kermanshai *et al.*, 2001).

El mecanismo de acción del bencil isotiocianato sugiere que es debido a la inhibición de la glucosa y al agotamiento de glucógeno (Moraes *et al.*, 2016).

Anteriormente se ha probado el efecto antihelmíntico de la semilla de papaya a través de extractos acuosos, sin embargo el potencial demostrado en estos ensayos no es el esperado; Bautista y Ovalle (2012) obtuvieron una eficacia del 18.6%, desafiando el extracto acuoso de semilla de papaya, sobre fases adultas de *H. contortus*, considerado un bajo efecto por los propios autores. Sin embargo, Zingare *et al.*, (2018) obtiene por el contrario resultados más favorecedores, con una disminución porcentual progresiva del conteo de huevos por gramo en heces, observó un 41,26% al tercer día de tratamiento, 73,80% al séptimo día y 90,47% al día 21. Ameen *et al.*, (2018) obtienen resultados similares, quienes atribuyen la eficacia a compuestos biológicamente activos principalmente papaína y bencil

isotiocianato, sin embargo, también resaltan la importancia de mejorar la biodisponibilidad de estos compuestos para mejorar su eficacia.

Poné y colaboradores (2011) evaluaron la actividad antihelmíntica contra larvas y huevos de *Heligmosomoides bakeri* en extractos acuosos y etanólicos de semilla de papaya (*Carica papaya*) reportando que el extracto acuoso era más potente en huevos que en larvas, sin embargo el extracto etanólico mostró una mayor eficacia en el desarrollo larvario produciendo una mortalidad del 96% contra el 68% frente al extracto acuoso.

Justificación

Las parasitosis gastrointestinales en pequeños rumiantes, especialmente en ovinos son una de las principales enfermedades para los sistemas extensivos de esta especie. El parásito implicado con mayor prevalencia es *Haemonchus contortus*, dada su característica hematófaga puede consumir entre 0.05 y 0.08 ml de sangre lo que conlleva a graves pérdidas de peso, anemia y en algunos casos hasta la muerte, generando grandes pérdidas económicas para los productores.

El control tradicional de las parasitosis se ha basado en fármacos sintéticos, sin embargo, el uso irracional e inadecuado de estos medicamentos ha provocado una gran resistencia por parte de los parásitos. Ante esta problemática se han buscado nuevas alternativas de solución entre las que se destaca a la herbolaria. La herbolaria se ha usado tradicionalmente como tratamiento contra diversas enfermedades entre ellas las parasitosis. La semilla de papaya (*Carica papaya*) se ha utilizado durante siglos como vermífugo en parasitosis humanas sin embargo su uso en medicina veterinaria no ha sido bien conocido y los estudios reportados muestran baja eficacia incluso menos al 30%. Se han reportado compuestos antihelmínticos presentes en la semilla de papaya que deben ser estudiados. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto antihelmíntico de los extractos orgánicos de la semilla de papaya *in vitro* contra L₃ de *H. contortus* e *in vivo* en modelos de jerbos (*Meriones unguiculatus*) y en ovinos (*Ovis aries*) sobre L₄ y adultos respectivamente.

Hipótesis

Los extractos orgánicos (extracto hexánico, extracto metanólico y extracto de acetato de etilo) de la semilla de papaya (*Carica papaya*) poseen actividad antihelmíntica *in vitro* sobre L₃ de *Haemonchus contortus*, *in vivo* sobre L₄ en modelos de jerbos (*Meriones unguiculatus*) infectados artificialmente y sobre parásitos adultos en ovinos (*Ovis aries*) en pastoreo infectados naturalmente.

Objetivos

Objetivo principal

Determinar la actividad antihelmíntica de los extractos orgánicos (extracto hexánico, extracto metanólico y extracto de acetato de etilo) de la semilla de papaya (*Carica papaya*) *in vitro* sobre L₃ de *Haemonchus contortus*, *in vivo* sobre L₄ de *H. contortus* en modelos de jerbos (*Meriones unguiculatus*) infectados artificialmente y sobre helmintos de ovinos (*Ovis aries*) en pastoreo infectados naturalmente.

Objetivos específicos

- Obtener compuestos con actividad antihelmíntica de semilla de papaya (*Carica papaya*) a través de solventes orgánicos y liofilizarlos.
- Determinar el efecto antihelmíntico de la semilla de papaya (*Carica papaya*) sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus*.
- Evaluar los extractos obtenidos a partir de la semilla de papaya (*Carica papaya*) sobre L₄ hematófagas de *H. contortus* en jerbos (*Meriones unguiculatus*).
- Desafiar el extracto de semilla de papaya (*Carica papaya*) con mayor actividad antihelmíntica en una infección natural de nematodos gastroentéricos en Tunja, Boyacá, Colombia.

Capítulo I: Efecto antihelmíntico de la semilla de papaya (*Carica papaya*) sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus*.

Materiales y métodos

Localización

Los ensayos *in vitro* e *in vivo* se llevaron a cabo en el laboratorio 3 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC), de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). La localidad está a 2,256 msnm, en el municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México. Posee un clima templado subhúmedo C(wo) con lluvias de verano y una temperatura media anual de 15.2 °C y una precipitación media anual de 612.1 mm (Mercado *et al.*, 2014).

Recolección de material vegetal y elaboración de extractos por polaridad.

La metodología utilizada fue la descrita por Marroquín-Tun (2017) para la maceración y extracción en solvente de semilla de papaya. La semilla de papaya se obtuvo en el mercado regional. Se llevaron al secado total en estufa a 60°C durante 48 horas, obteniéndose 170 g en base seca.

Las semillas se maceraron en mortero con pistilo y se mezclaron en partes iguales en tres diferentes solventes: hexano, acetato de etilo y metanol y se realizó una extracción en cada uno por 48 horas. Los extractos se filtraron y se secaron en rotaevaporador (Figura 4), se liofilizaron y se pesaron. Después de la obtención de los extractos (Figura 5) éstos se disolvieron con agua y se utilizaron para las evaluaciones *in vitro* e *in vivo*.



Figura 4. Extracción de extractos en rotaevaporador



Figura 5. Obtención de los extractos

Recolección de material biológico

Los huevos y larvas de *Haemonchus contortus* fueron obtenidos de un ovino donador infectado experimentalmente con 5000 L₃ de *H. contortus* propiedad de la FES Cuautitlán (Figura 6). Se recolectó la materia fecal y se recuperaron los huevos mediante la técnica de Coles *et. al.*, (1992) y para la obtención de larvas se siguió la metodología descrita por Corticelli-Lai modificada (2013).



Figura 6. Toma de muestra de materia fecal de ovino de la FES Cuautitlán.

Diseño experimental

Identificación de los compuestos reportados en la semilla de papaya

Se identificó el compuesto bencilisotiocianato en los extractos obtenidos a través de triple/cuádruple espectrometría de masas (TQ/MS; ACQUITY Ultraperformance coupled to an MS Xevo electrospray source, Waters Corp. Milford, MA, USA) en el extracto utilizando como compuesto estándar bencilisotiocianato Sigma-Aldrich®. El sistema fue operado utilizando modo electrospray positivo (ESI+) con metanol grado HPLC como solvente. El espectro fue obtenido a 20- 400V (Wang *et al.*, 2019).

Evaluación *in vitro* del efecto letal de Semilla de papaya sobre L₃

Para la evaluación sobre L₃ se utilizó la metodología descrita por Carvalho *et al.*, (2012), alrededor de 100 L₃ se depositaron en pozos de placas de ELISA (Figura 7) y se utilizaron los tratamientos descritos en la tabla 3, se realizaron tres repeticiones por tratamiento. Los extractos se evaluaron a las 24 y 48 horas posteriores en un microscopio óptico.



Figura 7. Placa ELISA para la evaluación *in vitro* del efecto letal de Semilla de papaya sobre L_3

Tabla 3. Diseño experimental para la evaluación de extractos de semilla de papaya sobre huevos y larvas

Tratamiento	n	No de L_3 por pozo	Concentración (mg/mL)
Albendazol	3	100	7
Testigo	3	100	-
Extracto hexánico de semilla de papaya	3	100	4
			2
			1
			0.5
Extracto en acetato de etilo de semilla de papaya	3	100	4
			2
			1
			0.5
Extracto metanólico de semilla de papaya	3	100	4
			2
			1
			0.5

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados por medio del programa Statgraphics (Centurion XV) mediante un ANOVA con comparación de medias por prueba de Tukey.

Resultados

Una vez que se obtuvieron las semillas y se secaron, se obtuvo alrededor de 1000 g de semilla de papaya (*Carica papaya*), los extractos obtenidos a partir de la extracción en solvente y los pesos se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Rendimiento de los extractos obtenidos a partir de la semilla de papaya.

Extracto	Peso (mg)
Hexánico de Semilla de papaya	50
Acetato de etilo de Semilla de papaya	60
Metanólico de semilla de papaya	30

En la espectroscopia de masas del extracto de acetato de semilla de papaya se evidencia que el bencil isotiocianato es el compuesto más abundante, como se puede observar en la figura 8 y 9.

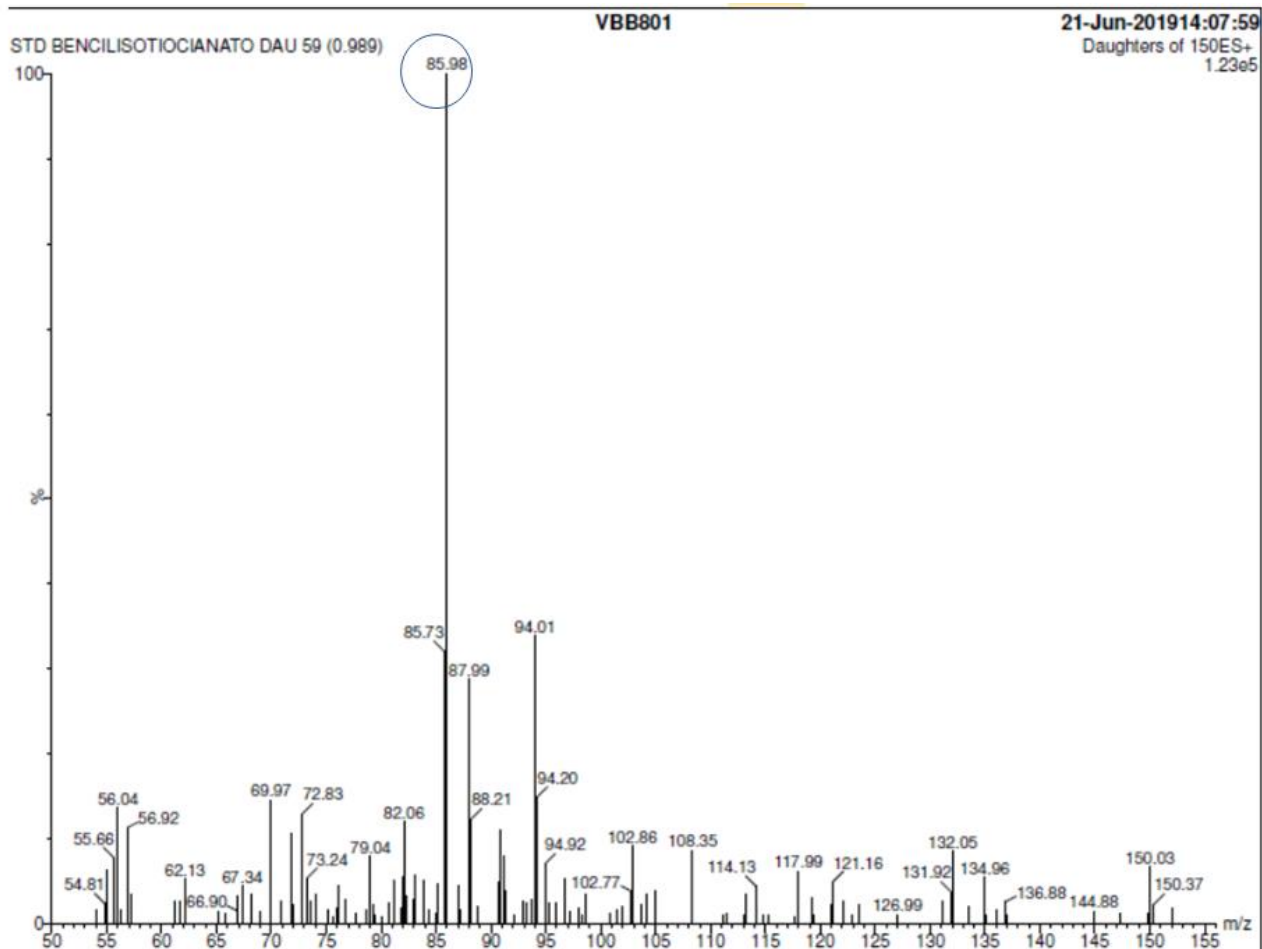


Figura 8. Espectrometría de masas de bencil isotiocianato Sigma-Aldrich ®

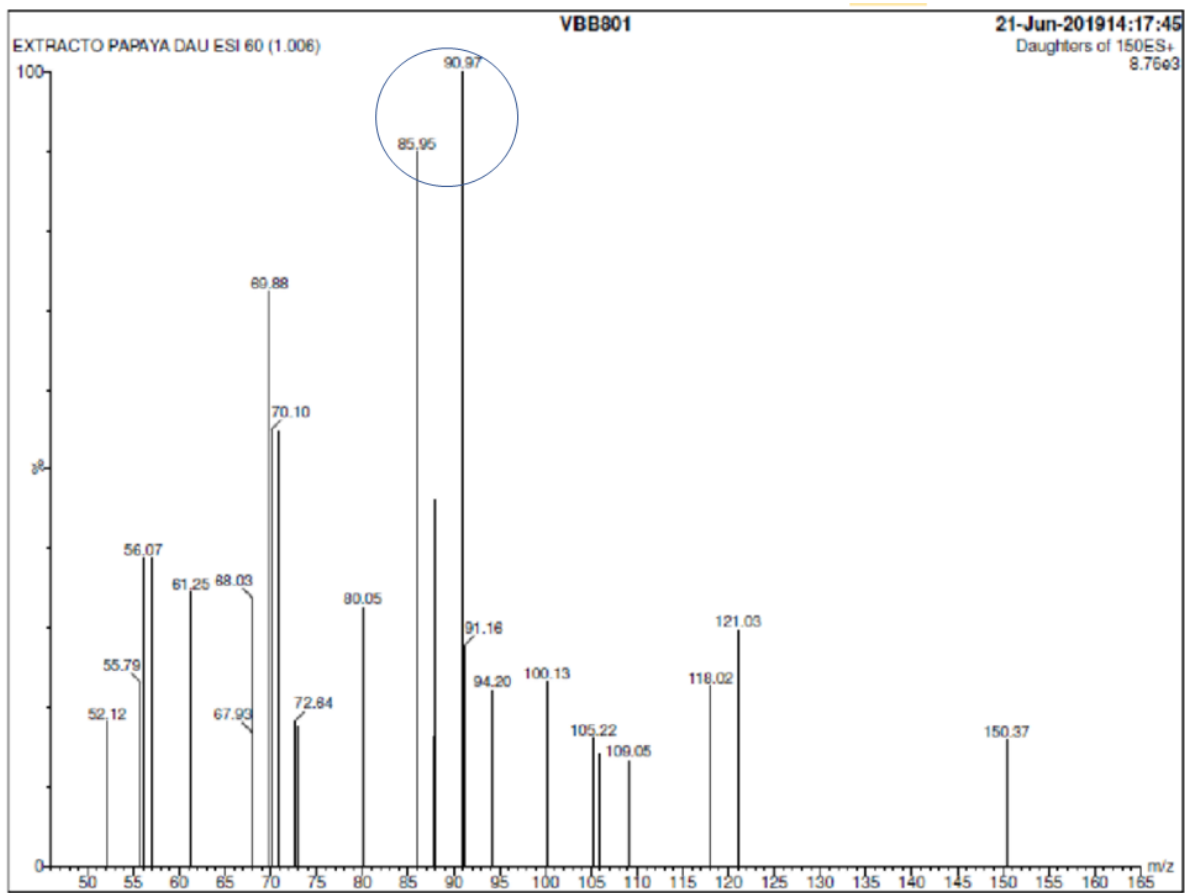


Figura 9. Espectrometría de masas del extracto de acetato de etilo de semilla de papaya (Carica papaya)

La tabla 5 muestra el porcentaje de letalidad de los extractos obtenidos por polaridad de la semilla de papaya (*Carica papaya*), donde se encontró que la fracción de acetato tiene un porcentaje de letalidad de 35.33% a una concentración de 4 mg/mL mientras que la fracción hexánica mostró 23.67% de letalidad en L₃ y la fracción metanólica de 17.33%.

Tabla 5. Porcentaje de letalidad de las fracciones obtenidas a partir de semilla de papaya (*Carica papaya*) en L₃ de *Haemonchus contortus*

Tratamiento	Concentración (mg/mL)	Efecto letal sobre L ₃ (%)
Albendazol	7	97.33 ^a
Testigo	-	0.00
Extracto hexánico de semilla de papaya	4	23.67 ^c
	2	14.67 ^d
	1	8.33 ^e
	0.5	2.67 ^e
Extracto en acetato de etilo de semilla de papaya	4	35.33 ^b
	2	35.67 ^b
	1	11.00 ^d
	0.5	3.33 ^e
Extracto metanólico de semilla de papaya	4	17.33 ^d
	2	6.33 ^e
	1	1.00 ^f
	0.5	0.00

Las letras en superíndice muestran diferencias significativas entre grupos. P<0.05

Discusión

El presente estudio proporciona evidencia de que los extractos orgánicos de semilla de papaya (*Carica papaya*) disponen de actividad antihelmíntica. Los resultados mostraron que todas las concentraciones de cada extracto tuvieron efecto significativo en la reducción de L₃ y que la eficacia aumenta al incrementar la concentración, esto se debe a metabolitos secundarios como alcaloides (Sapaat *et al.*, 2012), entre los principales compuestos está el bencilisotiocianato (BITC) (Zingare *et al.*, 2018), y las cisteín proteinasas dentro de las que se encuentra la papaína. Esta enzima ha reportado dañar la cutícula de los helmintos adultos al generar ampollas en la misma, provocando así su rápida digestión (Stepek *et al.*, 2004); Sin embargo, el extracto de acetato de etilo de semilla de papaya fue en el que se identificó mayor presencia de bencil isotiocianato (Figura 8), además mostró mayor eficacia al obtener un porcentaje más elevado en la mortalidad de L₃, en comparación con los otros dos extractos, lo que indica que existe una mayor efectividad en el uso de esta fracción de semilla de papaya, además de que es posible que en esta fracción se encuentre la molécula activa en mayor concentración.

Kermanshai y colaboradores en 2001 evaluaron la actividad del BITC y de los extractos acuosos y orgánicos de semilla de papaya contra *Caenorhabditis elegans*, encontrado resultados muy interesantes; los citados autores demostraron que el BITC con una pureza del 98% requiere sólo de 15.30 µmol para una dosis letal 90 (LC90), mientras que los extractos acuosos requieren de 12 a 24 µmol, un rango bastante amplio en comparación con los 16.39 µmol que requieren los extractos orgánicos. Lo que demuestra que el BITC está presente en ambos extractos sin embargo los extractos orgánicos requirieron una menor concentración para alcanzar la LC90.

La semilla de papaya en extracto de acetato de etilo mostró una letalidad de 35.33% a una concentración de 4 mg/mL. Estos resultados son similares pero no

comparables con los obtenidos por Rodríguez Molano *et al.*, (2019) donde obtienen un porcentaje de letalidad en extractos acuosos de semilla de papaya del 38.93% a una concentración de 100 mg/mL sobre L₃ de *H. contortus*, sin embargo la concentración utilizada para obtener ese resultado fue muy elevada en comparación con la de este estudio. Lo que sugiere que la semilla de papaya posee un considerable porcentaje de letalidad en los extractos etanólicos contra estadios larvarios, más esto no ocurre en los extractos acuosos.

Algo semejante ocurrió con Poné y colaboradores en 2011, donde evaluaron la actividad antihelmíntica contra larvas y huevos de *Heligmosomoides bakeri* en extractos acuosos y etanólicos de semilla de papaya reportando que el extracto acuoso era más potente en huevos que en larvas, sin embargo, el extracto etanólico mostró una mayor eficacia en el desarrollo larvario produciendo una mortalidad del 96% contra el 68% frente al extracto acuoso.

Nuestros resultados sugieren que el BITC es soluble en extractos etanólicos y a su vez uno o más principios activos también lo son, por lo que se hace necesaria la identificación de todas las moléculas activas que pudieran tener un efecto antihelmíntico presentes en la semilla de papaya.

Este estudio muestra resultados favorables evidenciando que los extractos orgánicos de semilla de papaya poseen actividad antihelmíntica contra L₃ de *H. contortus*, *in vitro* por lo que resulta necesario comprobar estos resultados en estudios *in vivo*.

Capítulo II: Efecto antihelmíntico de la semilla de papaya (*Carica papaya*) sobre larvas 4 hematófagas de *H. contortus* en jerbos (*Meriones unguiculatus*).

Materiales y métodos

Localización

Los ensayos *in vivo* en jerbos se llevaron a cabo con animales obtenidos del bioterio de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FESC, UNAM y la evaluación de estómagos se llevó a cabo en el laboratorio 3 de la misma dependencia.

Jerbos (*Meriones unguiculatus*)

Los jerbos fueron obtenidos de la colonia presente en el bioterio de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES Cuautitlán, de tres semanas de edad, utilizando machos y hembras.

Diseño experimental

Para la evaluación de los extractos sobre larvas en estadio 4 (L₄), se utilizaron cinco jerbos de tres semanas de edad por grupo de ambos sexos, para un total de 25 jerbos, los cuales se distribuyeron en cuatro grupos como lo describe la tabla 6.

Tabla 6. Diseño experimental para la evaluación de semilla de papaya sobre larva 4 en jerbos (*Meriones unguiculatus*)

Tratamiento	n	Dosis (mg/Kg)
Extracto hexánico de semilla de papaya	5	8
Extracto en acetato de etilo de Semilla de papaya	5	8
Extracto metanólico de Semilla de papaya	5	8
Agua destilada	5	-
Albendazol	5	3

La metodología seguida para el manejo, tratamiento y obtención de resultados fue la descrita por Squires *et al.*, (2011). Y se realizó de la siguiente manera como se observa en la figura 10 y se describe a continuación:



Figura 10. Cronograma de la metodología utilizada para la obtención y evaluación de larvas 4 basada en la descrita por Squires *et al.*, 2011

1. Desparasitación

Los jerbos fueron desparasitados vía oral con albendazol a una dosis de 3 mg/kg, siete días antes de comenzar con la inmunosupresión.

2. Inmunosupresión

La inmunosupresión se realizó con betametasona sal pura Sigma-Aldrich® (Figura 11) a una concentración de 10 mg diluida con agua destilada (1.5 mL) y se administró una dosis de 0.05 mg/kg PO durante 3 días consecutivos.



Figura 11. Administración de betametasona vía oral en jerbos

3. Infección con L₃ de *Haemonchus contortus*

Se utilizaron 10,000 L₃ desvainadas previamente con una solución de cloro al 0.183%, administrando 20 microlitros a cada jerbo PO con una micropipeta, y se dejaron descansar 2 días seguidos (Figura 12).



Figura 12. Botón de larvas concentradas y desvainadas en tubo eppendorf 1.5 mL

4. Tratamiento

Las fracciones fueron reconstituidas con agua destilada y se administraron a una dosis de 8mg/kg tal como se indica en la tabla 6 y se dejaron descansar tres días seguidos.

5. Sacrificio

El sacrificio se llevó a cabo en una cámara de CO₂, ubicada en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, a los 3 días posteriores al término del tratamiento. Se extrajo el estómago el cual fue incidido por la curvatura mayor, se lavó con buffer fosfato salino (PBS) y se rasgó ligeramente la mucosa.

6. Recuperación de larvas 4

Las larvas recuperadas del estómago de los jerbos se mantuvieron en una solución PBS a un pH de 7.4 a temperatura ambiente, posteriormente se realizaron dos lavados de la mucosa estomacal y se realizó un raspado y desintegración del estómago para recuperar larvas que hayan quedado dentro del tejido (Figura 13). Las larvas se cuantificaron a través de un microscopio estereoscópico.



Figura 13. Raspado de la mucosa del estómago

Análisis de porcentaje de reducción

El porcentaje de reducción se obtuvo siguiendo la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Reducción} = 100 \times ((C - T)/C)$$

Donde: C = media aritmética de las larvas de *H. contortus* encontradas en el grupo testigo, T= media aritmética de las larvas encontradas en los grupos tratados

Resultados

Las larvas recuperadas se cuantificaron y se obtuvo la fórmula de porcentaje de reducción, los resultados se observan en la tabla 7 en donde se observó que el extracto en acetato de etilo muestra un porcentaje de reducción de 60 ± 4.02 sobre L4.

Tabla 7. Porcentaje de reducción de larvas 4 en jerbos tratados con extractos orgánicos de semilla de papaya. ($P < 0.05$)

Extracto de semilla de papaya	Porcentaje de reducción (%) \pm desv. std
Hexánico	20 ± 2.5
Acetato de etilo	60 ± 4.02
Metanol	15 ± 0.62
Albendazol	100
Agua	-

Discusión

Diversas investigaciones científicas han atribuido las propiedades antihelmínticas de la semilla de papaya a distintos compuestos entre los que se encuentran al bencil isotiocianato y a las cisteín proteinasas (Moraes *et al.*, 2016; Kermanshai *et al.*, 2001), sin embargo, la mayoría de estos estudios se concentran en ensayos *in vitro*.

En el capítulo anterior los ensayos *in vitro* mostraron resultados favorables evidenciando que los extractos orgánicos de semilla de papaya poseen actividad antihelmíntica contra L₃ de *H. contortus*, por lo que uno de los objetivos de este estudio fue comprobar estos resultados en estudios *in vivo*, evaluando la actividad antihelmíntica presente en los extractos orgánicos de semilla de papaya en jerbos infectados experimentalmente con L₃ de *H. contortus*.

Los resultados mostraron que el extracto de acetato de etilo de semilla de papaya obtuvo un porcentaje de reducción larvaria del 60% \pm 4.02, mientras que el extracto hexánico obtuvo 20% \pm 2.5 y el extracto metanólico 15% \pm 6.2 en su porcentaje de reducción, todos los extractos utilizaron una concentración de 8 mg/kg. Demostrando así que el extracto de acetato de etilo presenta una mayor actividad antihelmíntica que los otros dos extractos tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* utilizando jerbos como modelo biológico, lo que sugiere que en este extracto es donde podría encontrarse la molécula activa en mayor proporción al ser soluble en extractos orgánicos principalmente en compuestos de polaridad neutra.

Squires *et al.*, (2011), utilizaron extractos etanólicos de *A. annua*, *A. absinthium*, *artemisinina* y un extracto etanólico y aceite esencial de *A. annua* para evaluar su efecto antihelmíntico en modelos de jerbos. Los resultados en extracto etanólico de *A. annua* por cinco días consecutivos de tratamiento obtuvieron un porcentaje de reducción del 24.7%, sin embargo, los propios autores consideraron que la reducción no fue significativa atribuyendo esto a que existen diferencias fisiológicas entre jerbos y rumiantes que pueden afectar la biodisponibilidad y actividad de los compuestos vegetales. Otros autores entre los que se encuentran Zamilpa *et al.*, (2018) estudiaron el efecto nematicida de los extractos de *n*-hexano de *Chenopodium ambrosioides* y *Castela tortuosa* sobre L₃ de *H. contortus* así como su efecto antihelmíntico sobre estadios preadultos de parásitos de jerbos y demostraron que la combinación de ambas plantas en el extracto orgánico presentó una eficacia en la reducción de la carga parasitaria del 57.3% en el estudio *in vivo*.

El uso de jerbos como modelo biológico para la evaluación de antihelmínticos representa una alternativa eficaz en el análisis de estos productos, en especial para

el caso de *H. contortus*, estudios recientes han demostrado que las L₃ desenvainadas artificialmente de este parásito eran capaces de crecer hasta el estadio L₄ y establecerse con éxito en el estómago de los jerbos, sin embargo el crecimiento era más lento en comparación con los ovinos (Yang et. al., 2017). Estos mismos autores evaluaron el número de larvas recuperadas del estómago de los jerbos a los cuatro, siete y 18 días post infección y encontraron que en el día siete post infección el número de larvas fue mayor que en los otros días, y al igual que en este estudio realizaron una inmunosupresión previa a la infección.

El uso de jerbos como modelos biológicos usados como hospederos de *H. contortus* para evaluar la actividad antihelmíntica de nuevos extractos representa una alternativa más económica y rápida para la evaluación de este parásito, al poder establecerse la infección y en el caso de los extractos orgánicos de la semilla de papaya se observan resultados favorecedores en especial en el extracto de acetato de etilo, lo que podría significar una alternativa para el control de este parásito en sus hospederos, por lo que se hace necesario evaluar este extracto en los ovinos.

Capítulo III: Efecto del extracto en acetato de etilo de semilla de papaya (*Carica papaya*) sobre una infección natural de nematodos gastroentéricos en Tunja, Boyacá, Colombia.

Materiales y métodos

Localización

Los experimentos *in vivo* en ovinos se realizaron en la Unidad de Producción Ovina de la Fundación Universitaria Juan de Castellanos, bajo la colaboración del Dr. Daniel Fernando González Mendoza. La localidad se encuentra a 2820 msnm en el municipio de Tunja, Boyacá, Colombia. Tiene una temperatura media anual de 12°C y una precipitación media anual de 645 mm (Rojas *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2018). Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de parasitología de la Fundación Universitaria Juan de Castellanos.

Unidades experimentales

Se utilizaron 24 ovinos de raza criolla, de diferentes edades alimentados en pastoreo y positivos a nemátodos gastroentéricos, los cuales nunca han sido desparasitados. Se obtuvo el conteo de huevos por gramo en heces (hpg) de los ovinos para determinar el nivel de parasitosis y distribuir los animales de forma aleatoria.

Diseño experimental

la metodología empleada se basó en el protocolo que establece la WAAVP (World Association for the Advancement for Veterinary Parasitology)

Antes de comenzar el tratamiento (día 0), los ovinos se dividieron en tres grupos según el número de hpg totalmente al azar con ocho individuos cada uno mediante el apoyo del programa Statgraphics (Centurion XV®).

El grupo uno se trató con el extracto de acetato de etilo de semilla de papaya debido a que fue el que obtuvo mejores resultados en las pruebas *in vitro* e *in vivo* realizadas previamente. El grupo uno se trató con extracto de acetato de etilo de semilla de papaya, una sola administración vía oral, 8 mg/Kg, la dosis se estableció según los resultados obtenidos en los bioensayos anteriormente descritos. El grupo dos se trató con levamisol a dosis de 7.5 mg/Kg una sola aplicación, vía subcutánea (Figura 14), el grupo tres fue el testigo y no se administró ningún tratamiento.



Figura 14. Administración de levamisol en ovinos de la Fundación Universitaria Juan de Castellanos, Boyacá Colombia.

La evaluación se llevó a cabo postratamiento a los días siete, 14 y 28 utilizando las siguientes variables:

1. Conteo de huevos por gramo (HPG) por la técnica McMaster descrita por Thienpont *et. al.*, 1986.
2. El método FAMACHA©, en el cual se evaluó el color de la mucosa ocular (Van Wyk y Bath, 2002).
3. La condición corporal siguiendo las indicaciones de Romero (2015) (figura 15).



Figura 15. Toma de condición corporal de ovinos de la Fundación Universitaria Juan de Castellanos, Boyacá Colombia.

4. El hematocrito mediante la técnica de microhematocrito descrita por (González y Villegas, 2006) (Figura 16).



Figura 16. Muestras de microhematorito en microcentrifuga

Para la técnica de microhematocrito las muestras de sangre se obtuvieron por venopunción yugular con equipo vacutainer (Figura 17) y mantenidas en tubos de hematología de polipropileno de 6 ml con tapón de goma con 10.8 mg de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Figura 18).

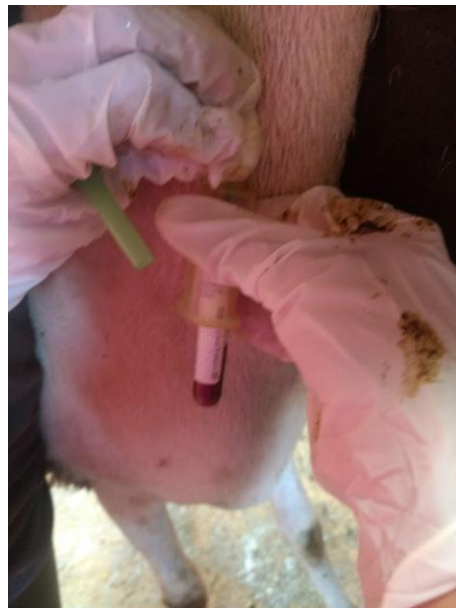


Figura 17. Toma de muestra por venopunción en ovino de la Fundación Universitaria Juan de Castellanos, Boyacá, Colombia



Figura 18. Conservación de muestras sanguíneas en tubos con etilendiaminotetracético (EDTA)

Las muestras de materia fecal se obtuvieron de manera individual directamente del recto, posteriormente se realizó la técnica de McMaster para el conteo de huevos por gramo por medio del microscopio óptico (Figura 19 y 20).



Figura 19. Observación al microscopio de huevos a través de una cámara McMaster

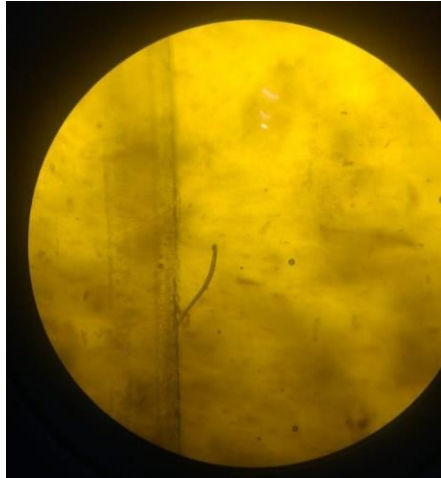


Figura 20. Larva observada al microscopio durante el examen

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de huevos por gramo (HPG) se llevaron a logaritmo base 10 y posteriormente las medias de huevos por gramo de los tratamientos se compararon utilizando un análisis ANOVA, con prueba de Tukey utilizando el software Statgraphics (Centurion XV®).

Utilizando el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu_1 + \mu_2 + \mu_3 + \epsilon_{ij}$$

Donde: Y_{ij} : Es la observación de la j -ésima unidad experimental del i -ésimo tratamiento.

μ_1 : Es la media del tratamiento con extracto de acetato de etilo de semilla de papaya

μ_2 : Es la media del tratamiento con levamisol

μ_3 : Es la media del tratamiento del grupo sin tratamiento

ϵ_{ij} : Es el error experimental de la unidad ij .

Resultados

La figura 21, muestra el efecto del extracto de acetato de etilo de semilla papaya en comparación con el grupo testigo y el grupo tratado con levamisol sobre la eliminación de huevos por gramo en ovinos infectados naturalmente con NGI. En donde se observan diferencias estadísticamente significativas ($P=0.05$) al día siete y 14 entre el grupo tratado con extracto de acetato de etilo de semilla de papaya y los grupos control.

Al examinar al grupo tratado con levamisol, observamos que el número de HPG incrementa desde el día 0 hasta el día siete post tratamiento, sin embargo a partir

del día siete hay una marcada disminución que se mantiene hasta el día 28 post tratamiento observándose diferencias estadísticamente significativas con el grupo testigo y con el grupo tratado con extracto de acetato de etilo ($P=0.05$).

El análisis estadístico mostró que los grupos control no muestran diferencias significativas entre ambos, sino hasta el día 28 ($P=0.05$).

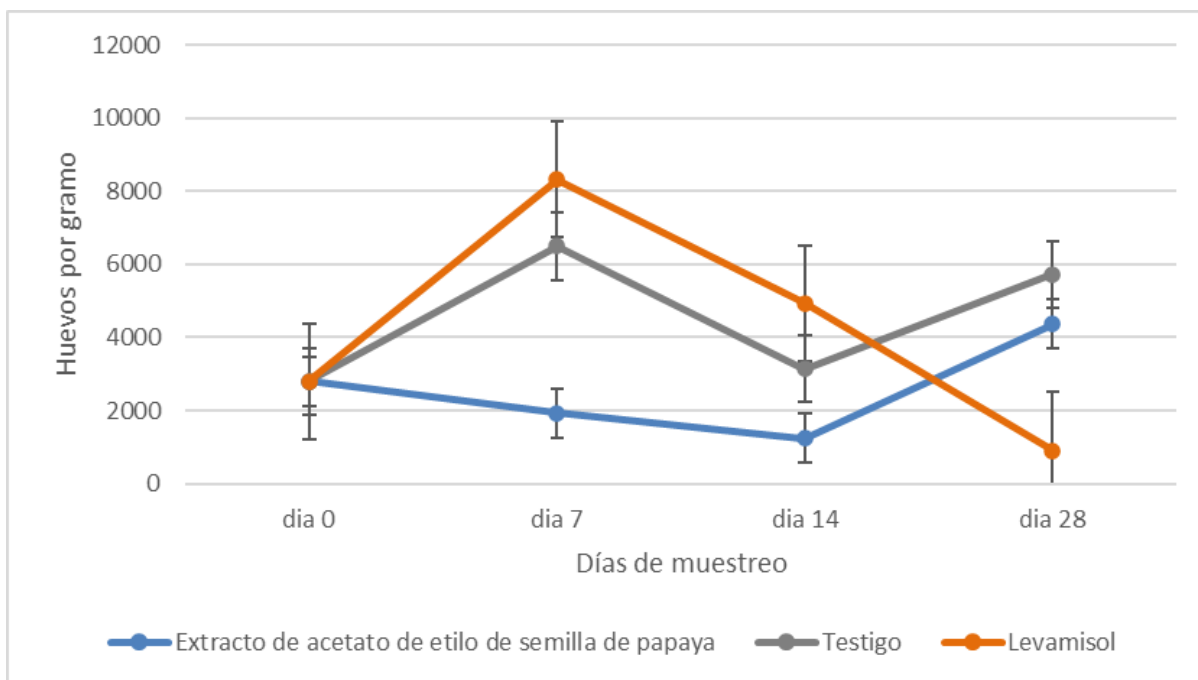


Figura 21. Efecto del extracto de acetato de etilo de semilla de papaya sobre la eliminación de huevos por gramo en corderos infectados naturalmente con nematodos gastroentéricos

Tabla 8. Porcentaje de reducción del número de huevos por gramo después del tratamiento de corderos infectados naturalmente con extracto en acetato de etilo de semilla de papaya. ($P=0.05$)

% Reducción	Día 7	Día 14	Día 28
Semilla de papaya	69.81	60.60	23.64
Levamisol	-29.69	-57.01	84.06
Testigo	-	-	-

Los resultados obtenidos en la tabla 8 muestran el porcentaje de reducción en el número de HPG posterior al tratamiento en ovinos con una infección natural, observándose una reducción del 69.81% a los siete días con el tratamiento de

extracto de semilla de papaya, el cual fue descendiendo a los 14 y 28 días (60.60% y 23.64% respectivamente). El levamisol no mostró los resultados esperados durante los primeros días, sino que a partir del día siete el porcentaje de reducción empezó a disminuir significativamente ($p= 0.05$).

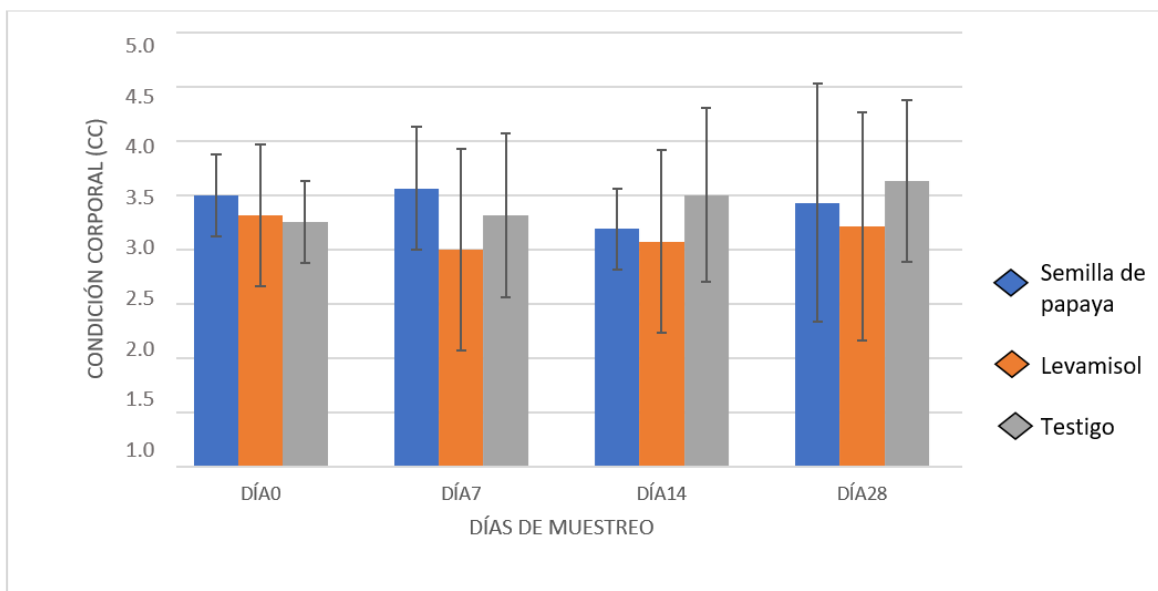


Figura 22. Porcentajes de condición corporal entre grupos experimentales durante 28 días ($p=0.05$).

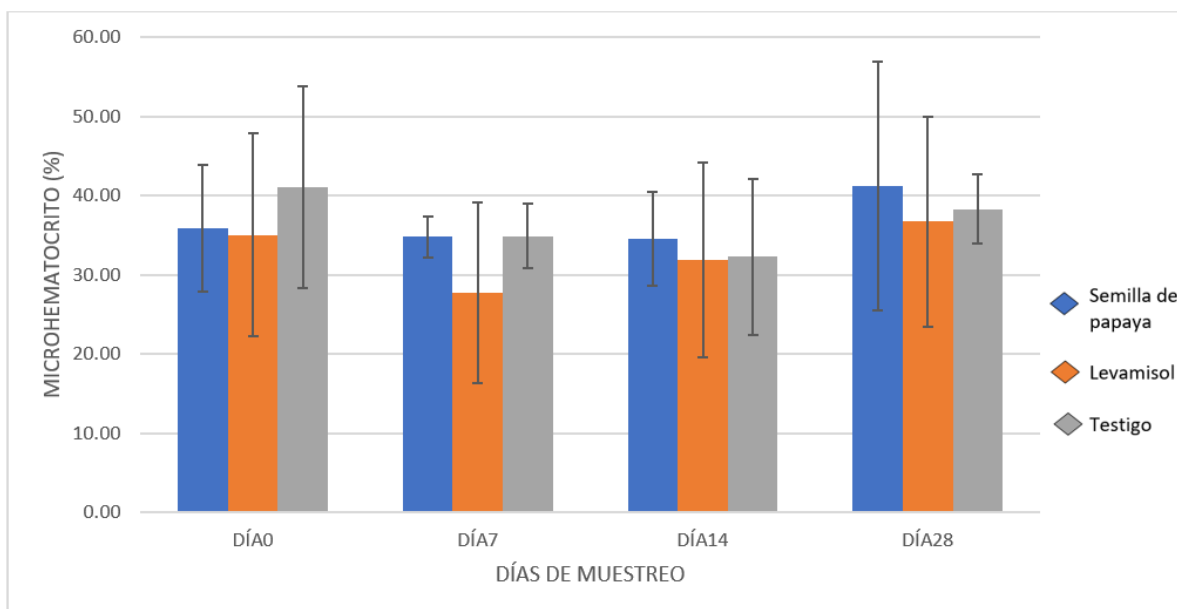


Figura 23. Porcentajes de microhematocrito entre grupos experimentales durante 28 días ($p=0.05$).

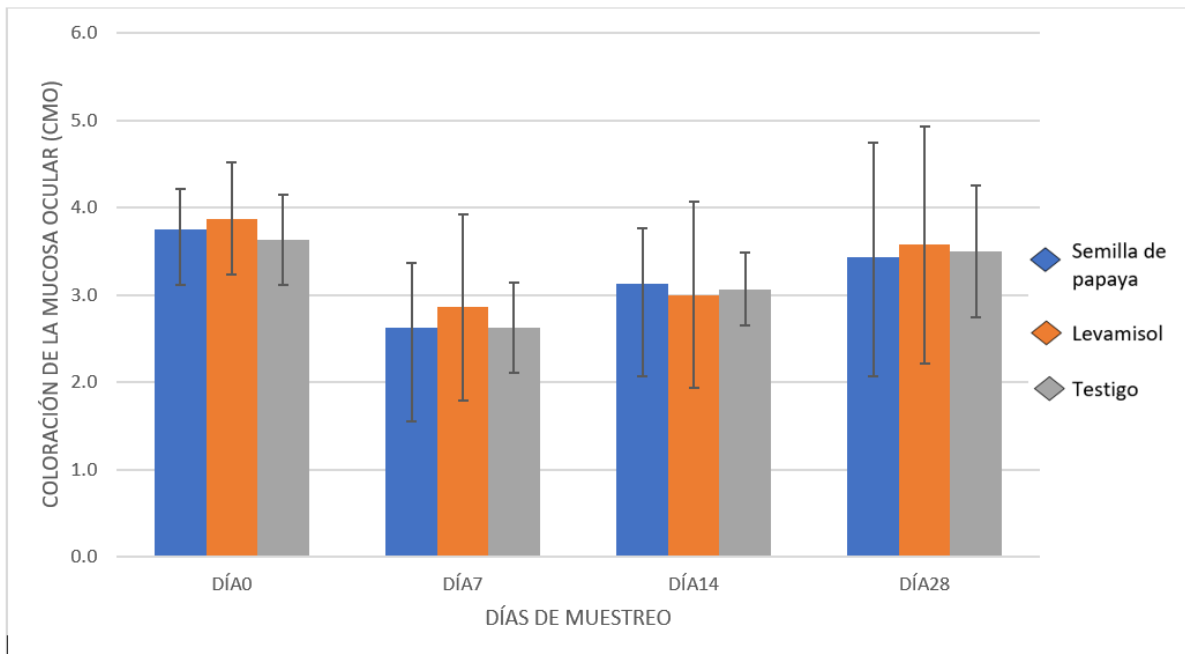


Figura 24. Porcentajes de coloración de la mucosa ocular entre grupos experimentales durante 28 días ($p=0.05$)

Las figuras 22, 23 y 24 presentan los resultados obtenidos en la evaluación física, teniendo en cuenta tres aspectos: La condición corporal (cc), el microhematocrito (%) y la coloración de la mucosa ocular (cmo).

La evaluación de la condición corporal teniendo una escala del uno al cinco donde uno indica animales muy delgados y cinco animales obesos, muestra resultados en donde la cc se mantiene en tres y cuatro. El grupo uno (extracto de acetato de etilo de semilla de papaya) mostró un aumento en la cc para el día siete mientras que para el día 14 hubo un descenso de casi 0.5 que fue incrementando, llegando casi a tres para el día 28. En el grupo dos (levamisol) ocurrió lo contrario, para el día siete hubo un descenso en la condición corporal que fue recuperándose para el día 14 y para el día 28. El grupo tres (testigo) mantuvo un incremento constante durante todos los días de muestreo aumentando alrededor de 0.5. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos ($p=0.05$).

Los resultados del microhematocrito mostraron un aumento casi constante durante cada día de muestreo en el grupo uno, en los días siete y 14 el porcentaje se

mantuvo y al día 28 hubo un aumento considerable. Caso contrario ocurrió con el grupo dos y tres en donde se observó una caída para el día siete que incrementó al día 14 y 28 para el grupo dos, sin embargo el grupo tres siguió mostrando una baja en el porcentaje al día 14 que volvió a aumentar hacia el día 28. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.05$).

La coloración de las mucosas a través de la técnica FAMACHA© mostró resultados similares en los tres grupos, sin diferencias estadísticamente significativas ($p=0.05$). Todos los grupos presentaron una disminución en la escala del cmo al día 7 que aumentó al día 14 y al día 28 constantemente.

Discusión

Los estudios realizados previamente tanto *in vitro* como *in vivo* utilizando modelos de jerbos, nos permitieron determinar al extracto con la mayor actividad antihelmíntica, así como la dosis más efectiva, el cual fue sometido a estudio utilizando ovinos con una infección natural. El extracto de acetato de etilo de semilla de papaya mostró actividad antihelmíntica sobre helmintos de ovinos, demostrando así que los extractos orgánicos de esta planta presentan efectividad sobre estos parásitos. El porcentaje de reducción obtenido para el día siete en nuestro grupo experimental fue de 69.81%, aproximándose al porcentaje mínimo requerido (70%) por la WAAVP (World Association for the Advancement for Veterinary Parasitology) para ser considerado como un antihelmíntico de importancia, por lo que, posiblemente obteniendo moléculas puras de este extracto se mejore el efecto.

Los resultados muestran que el porcentaje de reducción obtenido en el grupo uno (extracto de acetato de etilo) al día siete fue de 69.81%, llegando a 60.60% para el día 14 y a 23.64% para el día 28 post tratamiento. La cc al día siete aumentó, mientras que para el día 14 hubo una disminución en la misma que comenzó a aumentar nuevamente para el día 28, el microhematocrito se mantuvo en un aumento constante y el cmo disminuyó al día siete pero aumentó continuamente en los días 14 y 28, lo que sugiere que el extracto de acetato de etilo de semilla de papaya tiene efectividad contra nematodos hematofagos como lo es *Haemonchus contortus* en una infección natural en ovinos, al aumentar la cantidad de sólidos totales en sangre que mide la prueba de microhematocrito y a su vez la coloración de las mucosas oculares ir a la alza, teniendo animales con evaluaciones arriba de tres en la escala FAMACHA©. Una ventaja de este estudio es que las evaluaciones de la condición corporal y la coloración de las mucosas fueron hechas por la misma persona.

Algunos autores muestran resultados similares a los obtenidos en este estudio, Zingare *et al.*, en 2018 utilizaron un extracto acuoso de semilla de papaya contra varias especies de nematodos en caprinos y obtuvieron un porcentaje de reducción de 73.80% al día siete post tratamiento, cabe mencionar que la dosis utilizada fue de 100 mg/kg, administrada vía oral durante tres días. Sin embargo, al utilizar extractos acuosos se han encontrado resultados menos favorecedores, Bautista y Ovalle en 2012 obtuvieron una letalidad del 17% al día 28 después del tratamiento con extracto acuoso de semilla de papaya en dosis de 100mg/kg en dos aplicaciones con separación de 15 días entre estas, la metodología seguida por ambos autores fue similar a la de la presente investigación. No obstante, los extractos etanólicos han mostrado una mejor acción antihelmíntica en estadios larvarios que en huevos en comparación con los extractos acuosos (Poné *et al.*, 2011). Los resultados con extractos orgánicos de semilla de papaya muestran efectividad contra helmintos en ovinos al alcanzar un porcentaje de reducción del 69.81% al día siete post tratamiento, sin embargo estos resultados señalan que el extracto de acetato de etilo de semilla de papaya presentó un efecto inmediato más no un efecto residual, lo que sugiere administrar una segunda dosis a los 14 días posteriores a la primera.

Las pruebas mostraron resultados interesantes en el grupo dos, el cual fue sometido a tratamiento con levamisol a una dosis de 7.5 mg/kg SC, observándose una disminución en el porcentaje de reducción sólo del 29.69%, lo que sugiere que el grupo de ovinos utilizado para esta investigación probablemente se encontraba infectado con cepas resistentes a este antihelmíntico, del cual ya se ha reportado resistencia antihelmíntica (RA) en América Latina (Torres *et al.*, 2012). Sin embargo, en Colombia la información respecto a la RA en ovinos es escasa debido a que la investigación en esta área es insuficiente y a la falta de informes publicados (Torres *et al.*, 2012; Chaparro *et al.*, 2017). Aunque se desconoce la magnitud del problema en este país un estudio realizado por Chaparro y colaboradores en Antioquia, Colombia en 2017, utilizando la Prueba de Reducción del Conteo de Huevos (FERCT por sus siglas en inglés), demostró que *H. contortus* presenta resistencia a todas las clases de antihelmínticos disponibles en el mercado colombiano (benzimidazol, levamisol más triclabendazol y triclorfón, ivermectina y moxidectina) por lo que es probable que la situación sea similar en todo el país. Lo que hace necesario la implementación de nuevas alternativas de control ante esta problemática, por lo que se propone al extracto de acetato de etilo de semilla de papaya como una herramienta alternativa en el control integrado de parásitos, siendo necesarios más estudios que permitan conocer a todas las moléculas activas presentes en el mismo que permitan mejorar su potencial antihelmíntico.

Discusión general

Diversos autores han realizado estudios sobre la efectividad del uso de semilla de papaya como antihelmíntico, obteniendo resultados contradictorios al emplear extractos acuosos. Ameen (2018) utilizó un extracto acuoso de semilla de papaya y extracto crudo (en polvo) en cabras naturalmente infectadas con helmintos, a una dosis de 300mg/kg durante tres días, en este estudio se encontró una diferencia significativa en cuanto a la reducción de huevos de helmintos en heces con los extractos de semilla de papaya, en comparación con tiabendazol. Igualmente, Zingare y colaboradores (2018) utilizando una metodología similar a la del autor anterior obtuvieron resultados favorables, con un 73.8% de mortalidad al día siete de tratamiento utilizando extracto acuoso de semilla de papaya en cabras a una dosis de 100mg/kg durante tres días consecutivos. Por el contrario, Bautista y Ovalle (2012) obtuvieron resultados menos favorables utilizando extracto acuoso de semilla de papaya a una dosis de 100mg/kg aplicado dos veces con un intervalo de 15 días de separación entre estas en corderos infectados artificialmente obteniendo una eficacia sólo del 18.6%.

Los extractos orgánicos de semilla de papaya en contraste con los extractos acuosos han reportado resultados más favorables en estudios *in vitro* sobre estadios larvarios. Poné y colaboradores (2011) evaluaron la actividad antihelmíntica contra larvas y huevos de *Heligmosomoides bakeri* en extractos acuosos y etanólicos de semilla de papaya (*Carica papaya*) reportando que el extracto acuoso era más potente en huevos que en larvas, sin embargo el extracto etanólico mostró una mayor eficacia en el desarrollo larvario produciendo una mortalidad del 96% contra el 68% frente al extracto acuoso. Los resultados obtenidos en esta investigación son evidencia de que los extractos orgánicos de semilla de papaya tienen acción antihelmíntica contra L₃ de *H. contortus* siendo el extracto de acetato de etilo el que presentó un efecto mayor en comparación con los otros dos extractos, (extracto metanólico y extracto hexánico) al obtener un porcentaje de letalidad del 35.33% a una concentración de 4 mg/kg en el estudio *in vitro*; Lo que sugiere que el BITC encontrado en los extractos orgánicos por medio de una espectrometría de masas, es soluble en extractos orgánicos principalmente en el extracto de acetato de etilo y a su vez uno o más principios activos también lo son.

Algunos autores han reportado que el efecto antihelmíntico de la semilla de papaya se debe a la papaína y a la carpasemina contenida en las semillas (García *et al.*, 2019). Sin embargo, otros autores (Sapaat *et al.*, 2012, Zingare *et al.*, 2018, Stepek *et al.*, 2004, Kermanshai *et al.*, 2001) sugieren que el bencil isotiocianato (BITC) además de otros metabolitos secundarios son los responsables de la actividad antihelmíntica, por lo que se hace necesaria la identificación de todas las moléculas

activas que pudieran tener un efecto antihelmíntico presentes en la semilla de papaya.

Existen distintos estudios en los que se han utilizado jerbos como modelo biológico para evaluar el efecto antihelmíntico sobre *H. contortus* de diferentes extractos, como Squires *et al.*, (2011) que evaluaron extractos etanólicos de *A. annua*, *A. absinthium*, *artemisinina* y un extracto etanólico y aceite esencial de *A. annua*, sin embargo, sus resultados mostraron un porcentaje de reducción 24.7% tras 5 días consecutivos de tratamiento con extracto etanólico de *A. annua*; Por otro lado, Zamilpa *et al.*, (20128) probaron el efecto nematicida de los extractos de *n*-hexano de *Chenopodium ambrosioides* y *Castela tortuosa* sobre L₃ de *H. contortus* así como su efecto antihelmíntico sobre estadios preadultos de parásitos de jerbos, obtuvieron una reducción de la carga parasitaria de 57.3%. Comparablemente los resultados fueron alentadores con el uso de extractos orgánicos de semilla de papaya (*C. papaya*), en el cual se administró solo una dosis para cada extracto, obteniendo el porcentaje de reducción del extracto de acetato de etilo que fue del 60±4.02%, el del extracto hexánico fue de 20±2.5% y del extracto metanólico de 15±0.62%. Demostrando así que el extracto de acetato de etilo presenta una mayor actividad antihelmíntica en comparación con los otros dos extractos tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* utilizando jerbos como modelo biológico, lo que sugiere que en este extracto es donde podría encontrarse la molécula activa en mayor proporción al ser soluble en extractos orgánicos principalmente en compuestos de polaridad media.

La investigación brinda resultados satisfactorios sobre el uso de jerbos como modelo biológico para la obtención y evaluación de estadios larvarios 4 al infectar a los animales con L₃ previamente desenvainadas de *Haemonchus contortus*, por lo que se propone como una alternativa para el estudio de este parásito, siendo una opción más barata en comparación con los ovinos.

El extracto de acetato de etilo de semilla de papaya desafiado en ovinos en pastoreo con una infección natural de nematodos gastrointestinales obtuvo un porcentaje de reducción del 69.81% al día siete post tratamiento, acercándose sustancialmente al porcentaje mínimo requerido por la WAAVP (World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology) que es del 70% para ser considerado un antihelmíntico de importancia. Los estudios *in vivo* muestran resultados alentadores, que podrían mejorarse y alcanzar una mayor eficacia al obtener moléculas puras, lo que abriría la posibilidad del manejo antihelmíntico a través de extractos orgánicos de semillas de papaya y proponerlo como una herramienta alternativa en el control integrado de parásitos. La papaya al ser un fruto que se obtiene todo el año y que es consumido ampliamente por los mexicanos y colombianos puede hacer que este extracto

antihelmíntico sea una opción relativamente barata al ser obtenido de una planta que es cultivada localmente. Los medicamentos a base de plantas, derivados de especies que crecen y/o se cultivan localmente, probablemente sean más baratos y la disponibilidad de obtenerlos sea más fácil para los productores de menores recursos que los antihelmínticos sintéticos (Stepek *et al.*, 2004).

Para lograr un control efectivo y eficaz contra nematodos gastrointestinales en los ovinos, es necesario una combinación de estrategias de control. Dentro de las cuales, el método FAMACHA© permite identificar a los animales que presentan anemia y que suelen ser los animales susceptibles a nemátodos hematófagos como *H. contortus*. Usando el método FAMACHA© para evaluar la cmo encontramos que el grupo tratado con el extracto de acetato de etilo mostró animales con evaluaciones de 3 para el día siete, que fueron incrementando hacia el día 14 y día 28 llegando a una evaluación de 5. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos ($p=0.05$). Aún así la importancia del método FAMACHA© en conjunto con otras herramientas de evaluación como lo son el hematocrito y el conteo de huevos por gramo, se basa en correlacionar los resultados de estas pruebas para establecer una desparasitación selectiva dirigida, así como identificar animales resistentes y resilientes en el rebaño.

Una evaluación de la coloración de las mucosas bajo la técnica de FAMACHA©, así como del hematocrito y el conteo de huevos por gramo para determinar a los animales que deben ser desparasitados, sería una opción favorecedora para el uso de nuestro extracto. Considerando animales con evaluaciones de tres, cuatro y cinco en la escala de FAMACHA© con un hematocrito menor o igual a 15, 18 y 19% (Sotomaior, 2018). Efectuando las pruebas de forma rutinaria cada mes o cada dos meses para conocer la dinámica de eliminación de huevos y así poder determinar el momento idóneo para desparasitar (Cuéllar, 2008).

Como se ha mencionado en los párrafos anteriores, existen diversos estudios acerca de la efectividad de la semilla de papaya como antihelmíntico, sin embargo, cabe señalar las diferencias entre las metodologías utilizadas, como las dosis aplicadas, los días de administración, modelos biológicos y presentación de la semilla de papaya, por lo que se le atribuye a estas variables que los resultados cambien drásticamente. Sin embargo, al manejar los extractos por polaridad dentro de este estudio, nos aproximamos de manera más certera a la fracción molecular más efectiva de la semilla, lo cual, además de disminuir las discrepancias de efectividad como ocurre al utilizar extractos acuosos nos permite aumentar la letalidad utilizando únicamente la fracción efectiva, por lo que se hace necesario realizar más estudios que nos permitan encontrar a la o las moléculas activas.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos con el extracto de semilla de papaya, la fracción de polaridad media (acetato de etilo) mostró mayor eficacia en la actividad antihelmíntica contra *L3 in vitro* y contra *L4 in vivo* de *Haemonchus contortus* en jerbos (*Meriones unguiculatus*) como modelo biológico y se recomienda realizar una investigación más profunda para el aislamiento de la molécula activa.

En ovinos (*Ovis aries*) el extracto de acetato de etilo de semilla de papaya, alcanzó una letalidad del 69.81% en los primeros 7 días posteriores a su administración, se propone que su efectividad será aún mayor si se obtienen moléculas puras de este extracto, de esta manera pueda ser considerado un antihelmíntico de importancia por la WAAVP (The World Association for the Advancement for Veterinary Parasitology).

Con los resultados obtenidos en este estudio, se propone al extracto de acetato de etilo de semilla de papaya (*Carica papaya*) como una herramienta útil para el control integrado de parásitos.

Referencias bibliográficas

1. Aderibigbe S., Idowu S., Olaniyi A., Wright., Fatokun A. (2020). Bioactivity and cytotoxicity profiling of strictosamide and vincosamide, anthelmintic epimers from *Sarcocephalus latifolius* (Smith) Bruce leaf. Journal of Ethnopharmacology. 113142. DOI: doi.org/10.1016/j.jep.2020.113142
2. Aguilar-Caballero A., Cámara R. (2008). Inmunidad contra los nemátodos gastrointestinales: La historia caprina. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 9. 73 - 82.
3. Aguilar-Caballero A, Cámara R., Torres Acosta J, Sandoval Castro C. (2011). El control de los nematodos gastrointestinales en caprinos: ¿dónde estamos? Bioagrociencias. 4(2).10-16
4. Ahmed M., Laing M., Nsahlai I. (2012). In vitro anthelmintic activity of crude extracts of selected medicinal plants against *Haemonchus contortus* from sheep. Journal of Helminthology. 87(02). 1-6. doi:10.1017/S0022149X1200020X
5. Ameen S., Azeez O., Baba Y., Raji L., Basiru A., Biobaku K., Akorede G., Ahmed A., Olantude A., Odetokun I. (2018). Anthelmintic Potency of *Carica papaya* seeds against Gastrointestinal Helminths in Red Sokoto goat. Ceylon Journal of Science 47(2). 137-141. DOI: http://doi.org/10.4038/cjs.v47i2.7509
6. Andrade G., Delgado A., Herrera B., Arévalo L., Caso L. (2018). Variación de compuestos fenólicos totales, flavonoides y taninos en *Vanilla planifolia jacks.* ex Andrews de la Huasteca Hidalguense, México. *Agrociencia*, 52(1), 55-66.
7. Bautista O., Ovalle C. Evaluación de la eficacia de un preparado acuoso de semilla de papaya (*Carica papaya*) contra *Haemonchus contortus* en ovinos con infección artificial. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. 2012.
8. Berlinjn, Johan D. (1990). Fruticultura. Manuales para la educación agropecuaria. Edit. Trillas. México.
9. Buttle D., Behnke J., Bartley Y., Elsheikha H., Bartley D., Garnett M. (2011). Oral dosing with papaya latex is an effective anthelmintic treatment for sheep infected with *Haemonchus contortus*. Parasites and vectors. 2001; 4-36.
10. Cardona J., Álvarez J., Pérez J. (2017). Muerte súbita por alotrofia y hemoncosis en una cabra (*Capra aegagrus hircus*) del departamento de Córdoba, Colombia. Revista Colombiana de Ciencia Animal. 9(2):222-226. DOI: doi.org/10.24188/recia.v9.n2.2017.561

11. Carvalho C., Chagas A., Cotinguiba F., Furlan M., Brito L., Chaves C., et al. (2012). The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. *Vet. Parasitol.* 183,260-268. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.051>.
12. Chaparro J, Villar D, Zapata J, López S, Howell S, Lòpez A, Storey B. (2017). Multi-drug resistant *Haemonchus contortus* in a sheep flock in Antioquia, Colombia. *Veterinary parasitology.* 10: 29-34
13. Chomba-Angeles E., Quispe L. (2014). Semilla de papaya (*Carica papaya*) pulverizada como antiparasitario interno natural contra nematodos de monos fraile (*Saimiri sciureus*) en cautiverio. *Enfoque veterinario,* 1(1).
14. Coles G., Borgsteede F., Geerts S., Klei T., Taylor M., Waller P. (2012). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol,* 44, 35-44. DOI: [http://doi.org/10.1016/0304-4017\(92\)90141-U](http://doi.org/10.1016/0304-4017(92)90141-U).
15. Comans-Pérez R. J., Sánchez J. E., Laith Kalil Tawfeeq A., González-Cortázar M., Castañeda-Ramírez G. S., Mendoza-de Gives P., Sánchez-García A. D., Millán J., Aguilar-Marcelino L. (2020). Biological control of sheep nematode *Haemonchus contortus* using edible mushrooms. *Biological Control.* DOI: doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104420
16. Corticelli B, Lai M. 1963. Studies on the technique of culture of infective larvae of gastrointestinal strongyles of cattle. *Acta Medica Veterinaria Napoli* 9: 347-357.
17. Cuéllar J. (2007). Control no farmacológico de parásitos en ovinos. Nematodos gastroentéricos. Vº Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos, Mendoza, Argentina,
18. Das N., Goshwami D., Sharif Hasan Md., Zahir Raihan S., Kumar Subedi N. (2015). Phytochemical screening and in vitro anthelmintic activity of methanol extract of *Terminalia citrina* leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease.* 5(1). S166-S168. DOI: [doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)60881-7](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)60881-7)
19. Escribano C. (2019). Evaluación inmunológica de ovinos resistentes y susceptibles a la infestación por el nemátodo *Haemonchus contortus*. Universidad de la República Montevideo, Uruguay. 1-50.
20. García, E. M., González, V. H., Atariguana, G. C., Núñez, T. D. C., Pesántez, F. F., & González, K. Evaluación In vitro del potencial antihelmíntico de extractos de *Plantago major* y semillas de *Carica papaya*, usando como modelo experimental *Caenorhabditis elegans*. *Ciencia e Investigación,* 22(2), 9-16
21. Garduño, R. G., Hernández, G. T., Arellano, M. E. L., & de Gives, P. M. (2012). Resistencia antihelmíntica de nematodos parásitos en ovinos. *Revista de geografía agrícola,* (48-49), 63-74.

22. Gil AI, Miranda G (2008). Aspectos anatómicos de la semilla de la papaya *Carica papaya L* .*Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 2: 145-156
23. Imani-Baran A., Abdollahi J., Akbari H., Jafarirad S., Moharramnejad S. (2020). Anthelmintic activity of crude powder and crude aqueous extract of *Trachyspermum ammi* on gastrointestinal nematodes in donkey (*Equus asinus*): An in vivo study. *Journal of Ethnopharmacology*. 248. 112249. DOI: doi.org/10.1016/j.jep.2019.112249
24. Islam, M. R., Zahra, S. F. T., Sumon, S. I., Parvin, S., Hasan, K., Ahmed, M., Haque, T. (2019). Evaluation of anthelmintic activity of ethanolic extracts of *Carica papaya* leaves using *Paramphistomum cervi* and *Haemonchus contortus*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 13(12), 146-150.
25. Jacobs, D., Fox, M., Gibbons, L., & Hermosilla , C. (2016). *Principles of Veterinary Parasitology*. Wiley blackwell.
26. Johnstone, C. (1998). *Parásitos y enfermedades parasíticas de los animales domésticos*. Universidad de Pennsylvania. <http://cal.vet.upenn.edu/projects/merialsp/index.html>
27. José C., Méo S., Luz A., Carvalho C., Pacheco C., Pontes D., Cardosos D., Serafim da Silva g., Pererira J., Franco L., Lopes R., Fernandes R., Hayama T., Lorenzetti V., Beltrão M. (2012). Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. *Veterinary parasitology*, 187 (1-2), 296-216
28. Kahirul E., Stanley R., Netzel M., Fanning K. (2015). Phytochemicals of papaya and its traditional health and culinary uses – A review. *Journal of Food Composition And Analysis*, 41, 201-211. DOI: doi.org/10.1016/j.jfca.2015.02.010
29. Kermanshai R., McCarry B., Rosenfeld J., Summers P., Weretilnyk E., Sorger G. (2001). Benzyl isothiocyanate is the chief or sole anthelmintic in papaya seed extracts. *Phytochemistry*. 57. 427–435
30. Krishna KL, Paridhavi M, Patel JA (2008). Review on nutritional, medicinal and pharmacological properties of Papaya (*Carica papaya* Linn.). *Nat. Prod. Rad.* 7 (4): 364-373.
31. Lucius, R., Frank, B., Lane, R. p., Poulin, R., Roberts, C. W., & Grencis, R. K. (2017). *The Biology of Parasites*. Weinheim: Wiley-Blackwell.
32. Marroquín, M., Higuera R., López M., López R., de la Cruz H., Silva R., Cuéllar J., (2018). Efecto in vitro de los extractos hidroalcohólico y etanólico de semilla de papaya (*Carica papaya*) en *Haemonchus contortus*. *Ciencia y Agricultura*, 15(1), 53-59. [fecha de Consulta 26 de agosto de 2020]. ISSN: 0122-8420. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=5600/560063465007>
33. Mendes J, Tieme T, Barbosa M, Rodrigues W, Kaique J, Rolim R. (2020). *Haemonchus contortus* e Medidas Estratégicas de Controle para Ovinos.

- Ensaio e Ciencia. 24(2). p. 105-110. DOI: <https://doi.org/10.17921/1415-6938.2020v24n2p105-110>
34. Mendes, J. P., Tsuzuki, T. T., Ferreira, M. B., Garcia, W. R., Valentim, J. K., & Pietramale, R. T. R. (2020). *Haemonchus contortus* e Medidas Estratégicas de Controle para Ovinos. *Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde*, 24(2), 105-110.
 35. Mercado G., Ramírez M., Vizcarra I., López H., López D., Granados A., Reyes D., Chaires B. (2014). Distribución y probabilidad de la lluvia en Cuautitlán Izcalli, Estado de México. *Organización Mexicana de Meteorólogos*.
 36. Moraes D., Levenhagen M., Costa-Cruz J., da Costa-Netto A., Rodrigues R. (2016). In vitro efficacy of latex and purified papain from *Carica papaya* against *Strongyloides venezuelensis* eggs and larvae. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 59 (7). 1-6. <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-9946201759007>
 37. Moya M., Escudero V. (2015). Las plantas medicinales en el control de nemátodos gastrointestinales en cabras: potencial de las plantas que crecen en la región de Coquimbo, Chile. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 17(3), 480-494. DOI: doi.org/10.1590/1983-084X/13_103
 38. Navarro A., Rojas E., Lazcano M., Vera O. (2016). Propiedades funcionales de semillas de papaya (*Carica papaya* L.). *Revista de Ciencias de la Salud*, 3(7), 48-56.
 39. Padilla M. (2020). Estudio transversal de la infección por *Haemonchus contortus* en ovinos destetos de la granja Socorro del municipio de Turbaco, departamento de Bolívar. *Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales*.
 40. Peachey L., Pinchbeck G., Mathews J., Burden F., Behnke J., Hodgkinson J., (2016). Papaya latex supernatant has a potent effect on the free-living stages of equid cyathostomins in vitro. *Veterinary Parasitology*, 228, 23-29. DOI: [dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.07.036](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.07.036).
 41. Poné W., Ngankam Ntemah J.D., Bilong Bilong C., Mpoame M. (2011). A comparative study of the ovicidal and larvicidal activities of aqueous and ethanolic extracts of pawpaw seeds *Carica papaya* (Caricaceae) on *Heligmosomoides bakeri*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 447-450.
 42. Quiroz, H. (1994). *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. 5ta. UTEHA-Editorial Noriega SA México.
 43. Quiroz, H., Figueroa, J., Ibarra, F. y López, M. (Ed. 1) (2014c). *Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos*. Ciudad de México: UNAM
 44. Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W., & Constable, P. D. (2006). *Veterinary medicine a textbook of the diseases of cattle*. Elsevier.

45. Rodríguez J. G., Arece J., Olivares J. L., Alemán Y., Sánchez Y, (2015). Antihelmínticos, resistencia y método FAMACHA. Experiencia cubana en ovinos. *Revista de Salud Animal*, 37(1), 57-63
46. Rodríguez E., Pulido J., Montaña R. (2018). Evaluación de tres extractos de plantas para inhibir el desarrollo de larvas de los parásitos gastrointestinales de ovinos. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 23(3).
47. Rojas E., Arce B., Peña A., Boshell F., Ayarza M. (2010). Cuantificación e interpolación de tendencias locales de temperatura y precipitación en zonas alto andinas de Cundinamarca y Boyacá (Colombia). *Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 11(2):173.
48. Rojo F, González G, Hernández J, Martínez M. (2017). Resistencia genética a helmintosis digestivas. *Pequeños rumiantes*
49. Romero, O. (2015). Evaluación de la Condición Corporal y Edad de los ovinos. *Instituto de Investigaciones Agropecuarias*, 79, 1-94.
50. Sagüés F., Purslow P., Fernández S., Fusé L., Iglesias L., Samuell C. (2011). Hongos nematófagos utilizados para el control biológico de nematodos gastrointestinales en el ganado y sus formas de administración. *Revista Iberoamericana de Micología*. 28(4). 143-147.
51. Sarai, R. S., Kopp, S. R., Coleman, G. T., & Kotze, A. C. (2014). Drug-efflux and target-site gene expression patterns in *Haemonchus contortus* larvae able to survive increasing concentrations of levamisole in vitro. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4(2), 77-84.
52. Stepek G, Behnke J, Buttle D, Duce I. (2004). Natural plant cystein proteinases as anthelmintics? *Trends in Parasitology*, 20(7). 322-327
53. Taghreed B. Ibrahim and Olfat A. Mahdy, (2017). In vitro and In vivo Effects of *Carica papaya* Seed Extract on the Ultrastructure of the Tegument of *Prohemistomum vivax* (Sonsino, 1892) (Trematoda: Prohemistomatidae). *International Journal of Zoological Research*, 13: 45-53.
54. Taylor, M. A., Coop, R. L., & Wall, R. L. (2016). *Veterinary parasitology*. John Wiley & Sons.
55. Thienpont, D.; F. Rochette, y O. Vanparijs. 1986. Diagnóstico de las helmintiasis por medio del examen coprológico. *Janssen Research Foundation, Beerse, Bélgica*. 203 p.
56. Torres-Acosta J., Molento M., Mendoza de Gives P. (2012). Research and implementation of novel approaches for the control of nematode parasites in Latin America and the Caribbean: Is there sufficient incentive for a greater extension effort? *Veterinary Parasitology*. 186: 132-142
57. Torres-Acosta J, Mendoza de Gives P, Aguilar-Caballero A, Cuéllar-Ordaz J. (2012). Anthelmintic resistance in sheep farms: Update of the situation in the American continent. *Veterinary Parasitology*. 189: 89-96

58. Van Wyk, J.A., Bath, G.F., 2002. The FAMACHA© system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Veterinary Research* 33: 509–529.
59. Wood I, Amaral N, Bairden K, Duncan J, Kassai T, Malone J, Pankavich J, Reinecke R, Slocombe O, Taylor S, Vercruysse J. World association for the advancement of Veterinary Parasitology. (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Vet Parasitol* 1995; 58:181-213.
60. Yang Y., Guo X., Zhang H., Huang Y., Chen X., Du A. (2017). Characterization of the development of *Haemonchus contortus* ZJ strain from gerbils. *Parasites and Vectors*. 10:505. DOI 10.1186/s13071-017-2465-1.
61. Zamilpa A, García-Alanís C, López-Arellano ME, Hernández-Velázquez VM, Valladares-Cisneros MG, Salinas-Sánchez DO, Mendoza-de Gives P (2018). In vitro nematicidal effect of *Chenopodium ambrosioides* and *Castela tortuosa* n-hexane extracts against *Haemonchus contortus* (Nematoda) and their anthelmintic effect in gerbils. *Journal of Helminthology* 1–6. <https://doi.org/10.1017/S0022149X18000433>
62. Zingare, S., Pajai, K., Waghmare, S., Siddiqu, M. F. M. F., Kuralkar, S., Hajare, S., & Wankhade, V. (2018). Anthelmintic evaluation of *Carica papaya* against gastrointestinal helminths of goats. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(6), 1746-1748.