



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**DETERMINACION DEL POSIBLE EFECTO ANTIDIARREICO Y
DESPARASITANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Tagetes erecta* EN
RATONES CD1.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA

VICTORIA CAROLINA ALONSO VALENCIA

Asesores:

MVZ. José Ramírez Lezama

MVZ. Atonatiu Edmundo Gómez Martínez

Ciudad Universitaria, México D.F.

2014





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.

Agradecimientos

A mi *alma mater* la UNAM por permitirme cursar la carrera universitaria de mi elección, así como, por todas las actividades extracurriculares de las cuales disfrute mucho.

A la FMVZ por darme los conocimientos necesarios para abrirme camino en la vida y por enseñarme lo basto que es el universo de la Medicina veterinaria.

A la FQ por permitirme llevar a cabo el excelente y ameno servicio social, y la realización de mi tesis.

Al Dr. José Ramírez Lezama por su apoyo en la realización de la tesis y por estar siempre atento a mis dudas.

Al Dr. Atonatiu Edmundo Gómez Martínez por permitirme participar en el Bioterio de química, por el apoyo que brindo a mi tesis y por contestar a mis dudas, pero sobre todo por alentarme a buscar las respuestas por mí misma.

A la Dra. Ruth Bustamante García por su gran apoyo durante la realización de mi tesis y el servicio social, en especial por empujarme también a realizar mis metas.

A los 3 agradezco sus charlas y su amistad pero sobre todo sus consejos y su apoyo, no solo en el ámbito profesional, sino también en el personal. ¡Mil gracias!

A Angie Blancas por estar ahí para escuchar, por lo divertido que es platicar con ella, por su cafecito y por su gran apoyo durante el desarrollo de mi tesis.

A los ratones CD1, sin ellos no habría sido posible la realización de la tesis, así como, tampoco sería posible el avance de la ciencia.

Agradezco en especial a mis padres Rafael Carlos Alonso y Cristina Valencia González por apoyarme en todas las decisiones difíciles que enfrente en la carrera, por guiarme ¡Gracias a Dios! En el gran descubrimiento que realizamos juntos y sobre todo por su infinita paciencia, por escucharme y por apoyarme en todo lo que les fue posible.

Los cuentos de hadas superan la realidad, no porque digan que los dragones existen, sino porque nos dicen que pueden ser vencidos.

G.K. Chesterton.

INDICE.

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. HIPÓTESIS	4
3. OBJETIVOS	5
4. GENERALIDADES.....	6
4.1 Tagetes erecta (Flor de Cempazúchitl).	7
4.1.1 Propiedades farmacológicas.....	9
4.1.2 Química.	10
4.2 El ratón como animal de laboratorio.....	11
4.2.1 Anatomía y proceso digestivo.	12
4.3 Diarrea.	16
4.4 Fármacos más comúnmente utilizados contra la diarrea en la práctica de la Medicina Veterinaria.	19
4.5 PARÁSITOS GASTROINTESTINALES MÁS COMÚNMENTE ENCONTRADOS EN LOS RATONES DE BIOTERIO CONVENCIONAL	21
4.5.1 <i>Giardia muris</i>	21
4.5.2 <i>Hymenolepis nana</i>	23
4.5.3 <i>Hymenolepis diminuta</i>	25
4.5.4 <i>Syphacia muris</i>	27
4.5.5 <i>Syphacia obvelata</i>	29
4.6 FÁRMACOS UTILIZADOS CONTRA PARÁSITOS GASTROINTESTINALES EN RATONES.....	31
4.6.1 Benzimidazoles.....	31
4.6.2 Niclosamida.	32
4.6.3 Prazicuantel.	33
4.6.4 Metronidazol.	33
4.6.5 Ivermectina.	34
4.7 Estudio histopatológico.	35
5. PROCESO EXPERIMENTAL.....	39
5.1 EXPERIMENTO 1: PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA EN ARTEMIA SALINA	39

5.1.1. Diagrama de flujo. Experimento 1. Prueba de Toxicidad aguda en <i>Artemia salina</i>	42
5.2 EXPERIMENTO 2: EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIDIARREICO DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA FLOR DE CEMPAZÚCHITL.	43
5.2.1 Procedimiento.....	44
5.2.2. Diagrama de flujo. Experimento 2. Evaluación del efecto antidiarreico	50
5.3 EXPERIMENTO 3: EVALUACIÓN DEL EFECTO DESPARASITANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA FLOR DE CEMPAZÚCHITL.	51
5.3.1 Procedimiento.....	52
5.3.2. Diagrama de flujo. Experimento 3. Evaluación del efecto desparasitante.	58
6. RESULTADOS	59
6.1 EXPERIMENTO 1: PRUEBA DE TOXICIDAD CON <i>Artemia salina</i>	59
6.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIDIARREICO DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA FLOR DE CEMPAZÚCHITL.	60
6.3 EXPERIMENTO 2: EVALUACIÓN DEL EFECTO DESPARASITANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA FLOR DE CEMPAZÚCHITL	63
6.4 EXAMEN HISTOPATOLÓGICO.	71
7. DISCUSIÓN	72
8.CONCLUSIONES.....	74
9. ANEXO 1.....	75
10. BIBLIOGRAFIA	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Número de figura	Página
Fig. 1 Flor de Cempazúchitl	8
Fig. 2 Sistema digestivo del ratón	13
Fig. 3 División del estómago del ratón	14
Fig. 4 Trofozoitos de <i>Giardia muris</i>	22
Fig. 5 <i>Hymenolepis nana</i> A) Adulto acercamiento del escólex, B) Segmentos, C) Huevo	24
Fig. 6 Gorgojo	25
Fig. 7 <i>Hymenolepis diminuta</i> A) Huevo, B) Verme en estado adulto	26
Fig. 8 <i>Syphacia muris</i> A) Adulto, B) Huevos	28
Fig. 9 <i>Syphacia obvelata</i> A) Adulto, B) Acercamiento del Bulbo globular y alas cervicales, C) Huevo	29
Fig. 10 Sección de hembra de <i>Syphacia obvelata</i> grávida	30
Fig. 11 Microscopio fotónico	36
Fig. 12 Bloque de parafina con tejido	37
Fig. 13 A) Microtómo, B) Proceso de recolección de cortes	38
Fig. 14 Cámara de vidrio	40
Fig. 15 Incubación de <i>Artemia salina</i>	41
Fig.16 Proceso de elaboración del extracto acuoso de la Flor de Cempazúchitl A) Pesaje, B) Maceración C)Extracto terminado	44
Fig. 17 Sondeo esofágico	45
Fig. 18 Diluciones a 0.4 mg/kg y 0.008 mg/kg	54
Fig. 19 Prueba de Faust A) Material, B) Centrífuga	55
Fig. 20 Proceso de Histopatología A) Órganos en formaldehido, B) Carcasa para cortes histológicos	57
Fig. 21 Frecuencia acumulada de crustáceos de <i>Artemia salina</i> vivas vs muertas con respecto al logaritmo de la concentración A) Control positivo (dicromato de potasio), B) Extracto acuoso de flor de Cempazúchitl.	59
Fig. 22 Tejido intestinal de los ratones de los grupos con tratamiento	60
Fig. 23 Porcentaje del recorrido intestinal	62
Fig. 24 Huevos de <i>Syphacia obvelata</i> hallados con la técnica de Graham en las heces de ratón CD1	64
Fig. 25 Huevo de <i>Hymenolepis nana</i> hallado con la técnica de flotación en las heces de ratón CD1	64

Fig. 26 Promedio del número de huevos de <i>Syphacia obvelata</i> hallados en las 3 semanas de duración del experimento con la técnica de flotación	65
Fig. 27 Promedio de huevos de <i>Hymenolepis nana</i> , hallados en las 3 semanas de duración del experimento, con la técnica de flotación	66
Fig. 28 Promedio del número de huevos de <i>Syphacia obvelata</i> , hallados en las 3 semanas de duración del experimento con la técnica de Graham	68
Fig. 29 Promedio del número de huevos de <i>Hymenolepis nana</i> , hallados en las 3 semanas de duración del experimento con la técnica de Graham	69
Fig. 30 Vermes adultos en heces frescas de ratones. Las flechas indican la presencia de los parásitos.	70
Fig. 31.Vermes de <i>Syphacia</i> observados al microscopio fotónico a 10x A y B)Hembras grávidas y C) Hembra vacia	70

ÍNDICE DE CUADROS.

Número de cuadro	Página
Cuadro 1. Resultados de la medición de los intestinos de ratones CD1	61
Cuadro 2. Promedio de huevos de <i>Syphacia obvelata</i> e <i>Hymenolepis nana</i> , hallados con la técnica de flotación (0.4 mg/kg)	64
Cuadro 3. Promedio de huevos de <i>Syphacia obvelata</i> e <i>Hymenolepis nana</i> , hallados con la técnica de Graham (0.4 mg/kg)	67
Cuadro 4. Estudio Histopatológico.	71

ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Cloruro de calcio dihidratado
CEM	Tratamiento con el extracto acuoso de la flor de Cempazúchitl
cm	Centímetros
CTRL	Control
E.A.T.E	Extracto Acuoso de Tagetes Erecta
Fig.	Figura
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
g	Gramos
h	Hora
H0	Hipótesis nula
H1	Hipótesis alterna
H/E	Tinción Hematoxilina- Eosina
IVER	Tratamiento con Ivermectina
K ₂ Cr ₂ O ₇	Dicromato de Potasio
KCl	Cloruro de Potasio
Kg	Kilogramo
LOP	Tratamiento con Loperamida
mg	Miligramos
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Cloruro de Magnesio
mL	Mililitros
Na ₂ CO ₃	Carbonato de Sodio
NaCl	Cloruro de Sodio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de Sodio
p	Probabilidad
pH	Potencial de Hidrogeno
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
W	Watts.

RESUMEN

ALONSO VALENCIA VICTORIA CAROLINA. Determinación del posible efecto antidiarréico y desparasitante del extracto acuoso de *Tagetes erecta* en ratones CD1 (Bajo la dirección de: MVZ. José Ramírez Lezama y MVZ. Atonatiu Edmundo Gómez Martínez.)

La flor de Cempazúchitl es una de las plantas más utilizadas y reconocidas en la República Mexicana, tradicionalmente se considera de ornato, sin embargo, a lo largo de los siglos se utilizó también con propósitos medicinales. Entre los efectos que se le atribuyen se encuentran el antidiarréico y el desparasitante, los cuales fueron probados en el ambiente de un bioterio convencional en ratones CD1, con el propósito de afirmar o descartar la eficacia que presenta el extracto acuoso de esta planta con estos efectos. Se encontró que:

- El extracto acuoso de la flor de Cempazúchitl es una sustancia que presenta actividad biológica
- Posee un efecto antidiarreico muy similar a la Loperamida.
- Este mismo extracto acuoso de flor de Cempazúchitl (*Tagetes erecta*) presenta un efecto desparasitante parecido a la Ivermectina.
- Los estudios histopatológicos revelaron que no causa irritación o pérdida de la continuidad del tejido epitelial en el intestino de ratones

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de la medicina tradicional mexicana existe un gran número de plantas medicinales, que solían utilizarse con éxito para dar tratamiento contra enfermedades bacterianas, virales o parasitarias. Con la llegada de la conquista, muchos usos y costumbres indígenas fueron eliminados, sustituyéndolos por aquellos que realizaban los españoles, sin embargo, algunos conocimientos en medicina fueron salvados gracias a las recopilaciones de personas como Francisco Hernández, Martín de la Cruz o Bernardino de Sahagún (1) quienes en el siglo XVI crearon maravillosas obras como “La historia Natural de la Nueva España”; con el correr de los siglos y la aparición del pensamiento ilustrado también se dejaron de lado antiguas ideas europeas acerca de la enfermedad, sus causas y los remedios que se utilizaban para curarlas, sin darle importancia a la herbolaria hasta bien avanzado el siglo XX. Concretamente, fue en sus últimas décadas y las primeras del siglo XXI cuando la preocupación de la sociedad por los productos orgánicos o inofensivos con el ambiente, cambios de comportamiento como los movimientos veganos y el renovado interés de la comunidad científica hacia esta rama de la ciencia, que se buscó recuperar estos conocimientos. Tomando en cuenta que buena parte de las plantas de la medicina tradicional actualmente forman parte de los alimentos para los animales como aditivos, suplementos o colorantes, se propuso probar los efectos medicinales de una de las plantas más icónicas y reconocidas en la República Mexicana, específicamente la Flor de muerto o Cempazúchitl, a la cual se le atribuyen diferentes propiedades medicinales entre las que figuran antidiarreica y

desparasitante. Estas se pusieron a prueba en un ambiente controlado como lo es un bioterio convencional, donde a pesar de tomarse todas las medidas de bioseguridad de su tipo no es posible eliminar por completo las fuentes de contaminación, por lo general causada por el agua, el alimento o la viruta de madera que más frecuentemente es utilizada como cama para los animales de laboratorio, la que suele provenir de madererías comunes, en las que no se procura evitar el contacto de ésta con el suelo o los animales de la zona. En la mayoría de los casos, los bioterios convencionales, no poseen el equipo esterilizar estos materiales, con ello puede provocar la aparición de signos en los animales de laboratorio siendo la diarrea uno de ellos, que pudiera ser causada por la presencia de una enfermedad parasitaria. Con el propósito de proporcionar un tratamiento contra este tipo de enfermedades que sea seguro y no intervenga con los procesos de reproducción, mantenimiento y entrega de los animales al investigador; se realizó un extracto acuoso del total de la planta y se administró a ratones CD1. Estos experimentos podrían abrir la puerta a nuevas investigaciones del uso medicinal que se pueda dar a la flor de Cempazúchitl, la cual podría ser utilizada tanto en comunidades indígenas para eliminar los parásitos de una manera eficaz y económica en los animales de traspatio, como una alternativa natural en la medicina humana para la eliminación de este tipo de enfermedades.

2. HIPÓTESIS

1.- Dado que en la literatura se menciona que el extracto acuoso de *Tagetes erecta* posee pectina, quercetina y camferol entonces al administrarla en ratones CD1 presentará acción antidiarreica

2.- Debido a que en la literatura se menciona que el extracto acuoso de *Tagetes erecta* posee α -tertienilo entonces al administrarla en ratones CD1 presentará acción desparasitante.

3. OBJETIVOS

- 1.- Determinar el posible efecto del extracto acuoso de *Tagetes erecta* (flor de Cempazúchitl) como antidiarréico en ratones CD1.
- 2.- Determinar el posible efecto del extracto acuoso de *Tagetes erecta* (flor de Cempazúchitl) como desparasitante en ratones CD1.

4. GENERALIDADES

La humanidad en general ha utilizado desde épocas inmemorables plantas medicinales para atender sus problemas de salud. La Organización Mundial de la salud (OMS) estima que cerca del 80% de los habitantes de los países en desarrollo dependen de la utilización de la medicina tradicional para sus necesidades de salud con lo que se puede afirmar que, no solo se trata de una tendencia nueva marcada por la preocupación humana con respecto al medio ambiente o por la preservación de la medicina tradicional; también se ha despertado el interés científico en estos medicamentos (llamados fitofármacos) debido al resurgimiento de enfermedades que se creían erradicadas como la malaria y la tuberculosis, al incremento de los diagnósticos de cáncer o a la aparición de nuevas enfermedades como el Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (SIDA) o el Síndrome Agudo Respiratorio (SARS), por lo que es necesario la búsqueda de nuevas sustancias capaces de combatir estas enfermedades. Sin embargo una inmensa cantidad de fármacos disponibles en las farmacias son derivados de sustancias presentes en las plantas, se cree que por lo menos el 25% de estos contiene al menos una sustancia vegetal.

Es por esta razón que en los últimos años se ha realizado una integración de los fitofármacos al plan Nacional de Salud , creándose así enciclopedias que recogen los conocimientos tradicionales sobre el uso farmacológico de las plantas las que se encuentran a disposición del público como lo serían la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos o la Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, las cuales contaron con el apoyo de la Dirección de Medicina

Tradicional y Desarrollo Intercultural, la Universidad Nacional Autónoma de México. Estas enciclopedias cuentan con información referente a las plantas, sus usos medicinales y su composición química, así como una breve reseña histórica de la misma y de los usos que tradicionalmente se le adjudicaban. A continuación se exponen los datos referentes a la flor de Campazúchitl.

4.1 Tagetes erecta (Flor de Cempazúchitl).

Conocida comúnmente como flor de muerto o Cempazúchitl (Fig. 1), su nombre proviene del náhuatl cempoalli=muchas y xoxhitl=flor, lo cual se refiere a la gran cantidad de pétalos amarillos que da la ilusión de que se trate de un ramo pequeño. Es una flor nativa de la República Mexicana, presente en todos los estados, sin embargo en los estados de Baja California Sur y Norte, Nuevo León y Chihuahua no es cultivada (2). Especie herbácea dicotiledónea perteneciente a la familia de las Asteráceas, de 50 a 60 hasta 180 cm de altura (3), con tallo pubescente estriado, hojas de hasta 20cm de largo divididas en 11 a 17 segmentos lanceolados de hasta 5cm de largo, con el margen dentado y provisto de glándulas. Las flores son grandes y se dividen en, radiales que poseen lígulas de 1 a 2cm de largo, y del disco que poseen un tubo de 8 a 10mm de largo, son anaranjadas, amarillentas o rojizas, muy aromáticas, que se cultivan durante todo el año, principalmente en los meses de Septiembre, Octubre y Noviembre, se considera de ornato a pesar de tratarse de una maleza del maíz (4).



Fig.1 Flor de Cempazúchitl, fuente: <http://artenlazotea.mx>.

Sus propiedades fueron descritas desde el siglo XVI donde se le señala como ceremonial y estética, Francisco Hernández y Francisco Ximénez relatan que: “provoca la orina, quita el dolor de barriga, también se aprovecha para la tos, hace estornudar y atrae a la flema”. A finales del siglo XVIII, Vicente Fernández describe sus propiedades estimulantes, aperitivas y febrífugas. A finales del siglo XIX Eleuterio González menciona que “está recomendada contra los dolores y el tenesmo que acompañan a la disentería”; ese mismo siglo Francisco Flores refiere que “es muy útil en la cicatrización de heridas, contra el mal de ojo, las lagañas, ayuda en la expulsión de orina, contra la impotencia, provoca que regrese el flujo menstrual y como afrodisiaco” (3)

4.1.1 Propiedades farmacológicas

- Emenagogo (estimula el flujo menstrual cuando éste no se presenta por una razón distinta al embarazo)
- Antibacteriana: Contra *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Shygella dysenteriae*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphilococcus aureus* y *Escherichia coli* (5 y 6)
- Desparasitante: Contra helmitos, cestodos, nematodos y otros.
- Antimicótica: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus Niger*, *Aspergillus terreus*, *Candida albicans*, *Trycophyton rubrum*, entre otros.
- Antipirética
- Antirreumática
- Antiespasmódica
- Antidiarreica
- Cicatrizante
- Lactogoga (5 y 6).

Se ha utilizado de diferentes maneras, la planta completa en etanol al 95% se utiliza como anti fúngica, las flores en etanol tienen efecto anti crustáceo e insecticida, además de que estimulan la contracción del músculo liso (2 y 3), el extracto acuoso es el que presenta la actividad desparasitante y antidiarreica. La dosis recomendada tradicionalmente para este extracto es de 15g de la planta completa o de 3 a 4 flores secas para preparar un té por infusión y beber 3 veces

al día hasta por 15 días, si se desea aliviar el dolor de cabeza se utilizan solo las hojas, estas se mojan en aceite de oliva y se entibian, se colocan en las sienes como chiqueadores. Para bajar la leche se fríen las hojas en aceite, se entibia y se aplica frotando en el pulmón. Esta planta posee cualidades abortivas por lo que está contraindicada en la gestación (2).

4.1.2 Química.

Las hojas contienen un aceite esencial, en el que se han identificado geraniol, limoneno, linalol y su acetato (5), tagetina, mentol, ocimeno, dipteno, α y β pineno, tagetona, comferitrin, camferol y su aminoácido (2).

Los pétalos son ricos en carotenoides como luteína, xantofila y 5 esteroides de ambos componentes con ácidos grasos de 10, 16 y 18 carbonos, dipteno, quercetina, mentol, piretinas, tertienilo, pectina, flavonoides (3,5 y 6).

En la raíz se han identificado los componentes azufrados de bitienilo y α -tertienilo.

Conociendo todas las maravillosas propiedades que se le adjudican a esta planta la propuesta de este experimento es la de probar si su extracto acuoso posee un efecto antidiarréico y desparasitante, por lo que se decidió probarlo en ratones CD1.

4.2 El ratón como animal de laboratorio

El ratón de laboratorio pertenece a la especie *Mus musculus*, éste ha sido utilizado desde el siglo XVII en la investigación, pero obtuvo un gran papel en la biología a partir del siglo XIX; debido a que los recientes descubrimientos sobre los microorganismos patógenos y el renovado interés por el trabajo de Mendel, requerían de un animal que fuera pequeño, económico y del que se obtuvieran resultados en un periodo de unos cuantos meses comparados con los años que podría tomar este tipo de investigaciones en animales superiores o en seres humanos. Actualmente es la “estrella” en cuanto a investigaciones biomédicas y existen cientos de tipos de ellos como la cepa CD1 a la que se enfoca esta investigación. Esta es una de las cepas más utilizadas en los laboratorios de investigación, se trata de ratones albinos sin ninguna modificación genética de importancia, por lo que se les considera multipropósito, es decir, con ellos se pueden realizar cualquier tipo de investigaciones así se trate de la prueba de nuevos medicamentos o de mejoramiento de técnicas quirúrgicas, como de los síntomas que provoca el estrés o la depresión; estos ratones comparten las mismas características físicas y fisiológicas básicas con las demás cepas, a continuación se desglosa la anatomía del sistema gastrointestinal y el proceso digestivo que es hacia donde se enfoca esta investigación.

4.2.1 Anatomía y proceso digestivo.

Los ratones comparten una anatomía y fisiología similar a la de los humanos en cuanto a forma y función de los órganos, ambos poseen aparatos y sistemas tales como el digestivo que es sobre al cual se dirige esta investigación, siendo más específicos en la porción tubular la cual consiste en esófago, estómago, intestino delgado (el cual se divide en duodeno, yeyuno e íleon), intestino grueso, ciego y colon (7) (Fig. 2).

El esófago es el órgano que conecta la faringe con el estómago, se encuentra en el cuello, dorsal a la tráquea, continua hasta el tórax y baja a cavidad abdominal, las capas del esófago son (de interna a externa) mucosa, muscular de la mucosa, y muscular. El tejido de las últimas 2 capas varía de acuerdo a la localización del órgano, en la porción cervical y torácica distal ésta será de músculo estriado esquelético, pero en la porción torácica proximal al cardias será cambiada por músculo liso. El bolo alimenticio ingresa a este órgano y es empujado hacia el estómago mediante una serie de contracciones y relajaciones simétricas, llamadas peristaltismo (7 y 8).

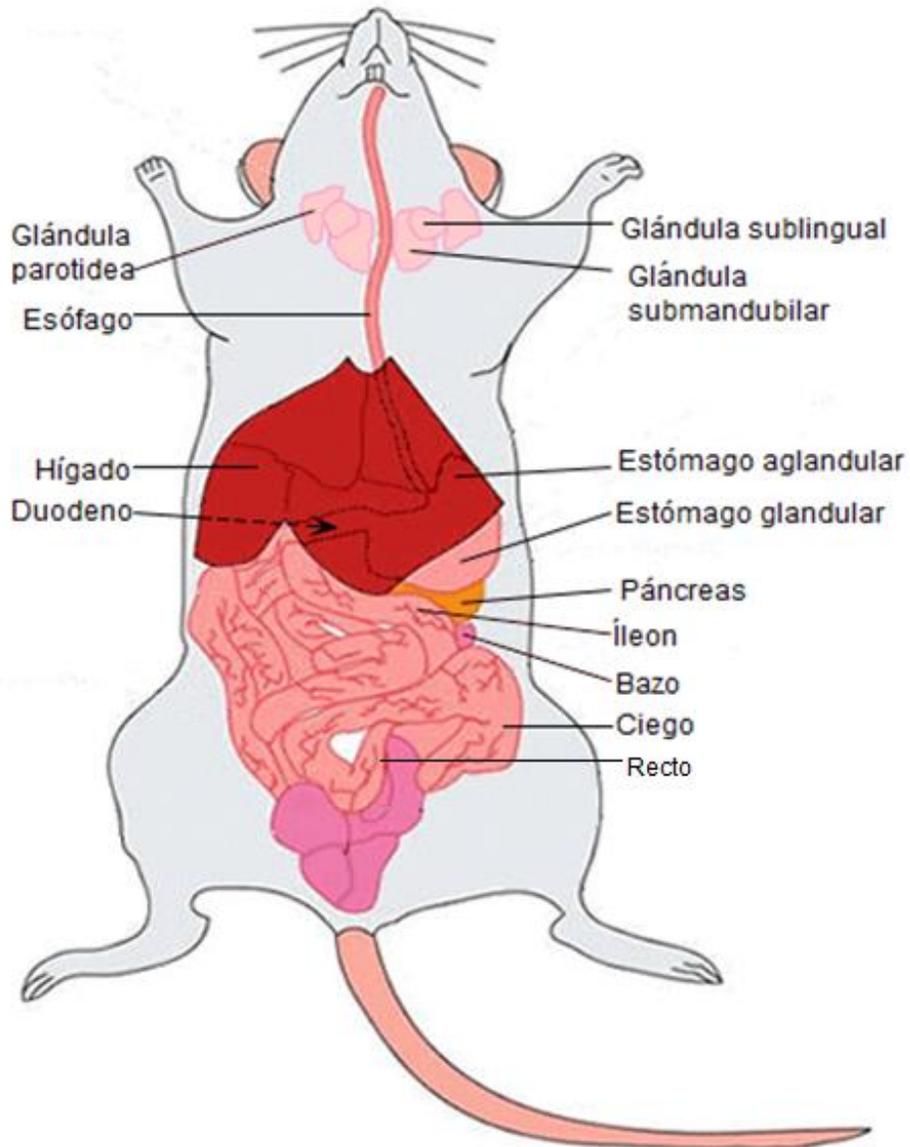


Fig. 2. Sistema digestivo del ratón, fuente: <http://ctrngenpath.net>

El estómago es un saco hueco localizado justo debajo del diafragma en el lado izquierdo del abdomen, éste presenta 2 porciones en los ratones, aglandular y glandular, están divididas por una porción de tejido conocida como *margo plicatus* el cual es visible a simple vista (Fig. 3), la primera porción consiste en las mismas capas que el esófago, con la adición de la serosa, que es una capa de tejido epitelial y conjuntivo que protege al órgano en su región externa (8 y 9); esta

porción actúa únicamente como un almacén de alimento. La segunda porción posee en su capa mucosa una serie de glándulas que se arreglan formando pocillos profundos dentro del tejido, estas glándulas secretan pepsina, ácido clorhídrico, mucina y zimogeno, que son sustancias encargadas de iniciar la digestión. Es durante este proceso que los músculos del estómago se encargan de mezclar el bolo alimenticio con el ácido y las enzimas gracias a los movimientos peristálticos, los cuáles además reducen el tamaño de la partícula para que pueda seguir su camino hacia el esfínter pilórico (7 y 8).

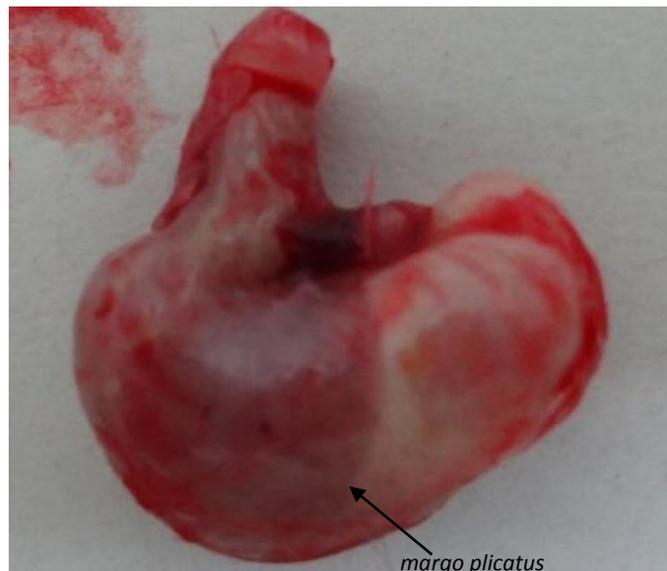


Fig. 3 División del estómago del ratón

El esfínter pilórico es una válvula encargada de controlar el paso del contenido estomacal al duodeno que es la primera porción del intestino delgado la cual tiene la forma de una "U", a esta porción llegan sustancias producidas por el páncreas, bilis que procedente de la vesícula biliar y de una secreción alcalina rica en moco proveniente de las glándulas de duodenales; las cuales se mezclan con el contenido del estómago llamado de ahora en adelante quimo, además de que se

liberan también enzimas como la pepsina, tripsina, elastasa, etc. que descompondrán las proteínas, los ácidos grasos, los azúcares y los lípidos en moléculas más pequeñas que serán fácilmente absorbidas (7). En el intestino delgado se encuentran unas proyecciones con forma de tentáculos conocidas como vellosidades, estas son la unidad absorbente del intestino, tienen la capacidad de absorber agua, aminoácidos, vitaminas entre otros para diseminarlos por todos los enterocitos y al torrente sanguíneo (7). En el duodeno se encuentra la máxima concentración de vellosidades, conforme se avanza en dirección al intestino grueso el número de éstas desciende; las vitaminas liposolubles se absorben en el íleon y yeyuno. En el íleon se encuentran las placas de Peyer, que son cúmulos de tejido linfóide en el sistema digestivo, es en este sitio donde se encuentran los conductos quilíferos dentro de las vellosidades, estos son los encargados de la absorción de lípidos y de las vitaminas A,D,E y K (7).

Los restos que no pudieron ser absorbidos, así como células epiteliales de descamación y algunas enzimas digestivas y mucinas pasan al ciego, que sirve de unión entre el íleon y el colon. En los roedores el ciego funciona como una cámara de fermentación, en la cual, las bacterias se encargan de las fibras y de otros compuestos que no fueron digeridos y sintetiza metabolitos útiles como la vitamina K y algunas vitaminas del complejo B, sin embargo, no todos estos metabolitos pueden ser absorbidos así que algunos son desechados en las heces, por lo que para obtener estos nutrientes los animales practicarán la cecotrofia (7). Al final del colon se encuentra el recto, donde los remanentes se almacenarán,

ahora conocidos como “heces”, la mucosa del recto se encarga de producir moco para lubricar la salida de las heces, la capa longitudinal del recto es delgada si se compara con la del colon, además de que presenta 2 listones de músculo liso conocidos como Taenia coli, la musculatura del esfínter anal es lisa en el interior y estriada en su exterior lo que permite el control voluntario del esfínter. (8 y 9)

En algunas ocasiones los procesos de digestión y absorción por parte del intestino se ven alterados o inhibidos, esto puede ser provocado por la presencia de organismos patógenos, como por condiciones en el ambiente de los animales que les impidan llevar a cabo las actividades propias de su especie; esta alteración puede provocar tanto un aumento en volumen como en frecuencia de la expulsión de las heces, conocido como diarrea.

4.3 Diarrea.

Se trata de la presencia de un exceso relativo de agua en las heces en proporción a la materia seca presente en ellas, lo cual puede provocar una disminución severa de electrolitos, un desequilibrio ácido base y deshidratación (10).

Normalmente grandes cantidades de líquido derivados de la ingesta y la secreción del estómago, ingresan en el intestino delgado, además del movimiento pasivo de agua, desde la circulación llegan a la parte superior de este gracias a efectos osmóticos; aparte de que la absorción de electrolitos y moléculas nutritivas osmóticamente activas llevan agua desde la luz al espacio intersticial. El intestino tiene una capacidad natural de absorción tan eficiente que solo una pequeña fracción de toda esta agua pasa al colon. Además de su función fermentativa, el

colon tiene la responsabilidad fundamental de conservar los electrolitos y agua, minimizando así las pérdidas fecales; sin embargo esta es finita y si la tasa que ingresa desde el intestino delgado supera esta capacidad, se produce la diarrea (10).

Se puede clasificar la diarrea de la siguiente manera

- **Secretoria.** Debida a un desarreglo de los mecanismos absorbentes y secretorios normales de la mucosa. Esta es generalmente producida por enterotoxinas bacterianas, las cuales cortan el transporte de cloruro de sodio en la membrana celular luminal, reduciendo la absorción pasiva de agua, mientras tanto en las criptas se promueve la secreción de cloro y el agua lo sigue, este aumento de secreción y reducción de absorción aumenta la carga de solutos y agua que pasa al colon (10).
- **Malabsorción.** Resulta comúnmente por la atrofia de las vellosidades sin importar cuál sea la causa; como resultado del área superficial de absorción reducida, los electrolitos y los solutos nutritivos son retenidos en la luz intestinal en cantidades anormales junto con el agua asociada a ellos. De no producirse una absorción compensatoria en el intestino delgado más distal, el soluto adicional y el agua son pasados al colon (10).
- **Permeabilidad aumentada.** La mucosa permite un movimiento retrogrado y aumentado de solutos y líquido desde el espacio intercelular a la luz del órgano o facilitando la trasudación de líquido tisular (10).

Por lo general este tipo de diarrea provoca que el intestino este flácido y lleno de líquido, la hipermotilidad se produce como respuesta al volumen aumentado de líquido en el órgano.

- **Fermentativa.** La mucosa del colon es innatamente menos permeable que la mucosa del intestino delgado debido a sus uniones estrechas entre las células epiteliales por lo que resiste mejor las alteraciones de la presión hidrostática aumentada, pero la erosión o ulceración del tejido produce una reducción de esta función por la pérdida del epitelio superficial absorbente. Sin embargo, también él envió de un gran volumen de sustrato fermentable por parte del intestino delgado al colon inicia la sobrecarga osmótica del mismo en especial sí se trata de carbohidratos mal absorbidos, lo que conduce a la producción aumentada de moléculas de ácidos grasos volátiles y causa una reducción en el pH, esto altera la flora intestinal causando la proliferación de microorganismos que producen ácido láctico; la rápida acidificación del medio provoca aumento de permeabilidad en la mucosa provocándose un aumento en el pasaje de cantidades pequeñas de heces líquidas. (10)

El Médico Veterinario puede hacer uso de diferentes fármacos para aliviar este molesto signo en los pacientes, sin embargo entre los animales de laboratorio no es común que se utilicen fármacos para aliviar la diarrea, es más importante realizar diversas técnicas de diagnóstico para encontrar el agente patogénico o la enfermedad que la produce, ya la eliminación de los animales que presentan este

problema es la primera acción a realizar, con el propósito de evitar que los animales de un área entera se enfermen. Sin embargo es importante conocerlos.

4.4 Fármacos más comúnmente utilizados contra la diarrea en la práctica de la Medicina Veterinaria.

Caolín/ Pectina.

Se trata de un compuesto formado por silicato de aluminio hidratado y un polímero de ácidos poligalacturónicos. Se encontrara en la naturaleza por separado como caolina (un tipo de arcilla) y pectina la cual está presente en cantidades abundantes en las manzanas. Se cree que su combinación posee propiedades adsorbentes y antiinflamatorias, además de que se trata de agentes gelatinizantes por lo que se mejora la consistencia de las heces, se regula el tránsito gastrointestinal y favorece el crecimiento bacteriano lo que aumenta el volumen de fecal. Para que se presente un efecto tangible debe utilizarse en volúmenes grandes, por lo que no se recomienda su uso en roedores. Entre sus efectos adversos encontramos el estreñimiento y la impactación fecal en especial en animales jóvenes (11) (12).

Subsalicilato de bismuto

Se trata de un polvo blanco inodoro e insípido que contiene al menos 58% de bismuto, es insoluble en agua, alcohol y glicerina, posee efectos antiseoretos, antimicrobianos y antiácidos, a nivel de musculo liso disminuyen la liberación de prostaglandinas, disminuye los movimientos peristálticos. El bismuto por si solo se utiliza como protector de la mucosa y como medio de contraste para estudios

radiológicos. El único efecto adverso observado es la conversión del medicamento a sulfitos de bismuto causando un oscurecimiento temporal de la lengua y las evacuaciones (13).

Loperamida.

Es un opioide derivado sintéticamente de la piperidina; actúa como agonista de los receptores mu opiáceos, disminuye la liberación de mediadores químicos como la acetilcolina y las prostaglandinas con lo que se reduce la peristalsis, inhibe asimismo a la calmodulina lo cual disminuye la contracción del músculo liso, estimula la absorción intestinal y reduce la secreción. Los efectos adversos se consideran moderados como el estreñimiento, náuseas y vomito (11) (12).

Junto con la anorexia y letargia, la diarrea es un signo muy común de enfermedad en ratones, la causa puede ser multifactorial, una de las causas son los agentes patógenos, siendo los parásitos gastrointestinales los de mayor frecuencia. Es por eso que es importante conocer cuáles son los parásitos que se encuentran más comúnmente en ratones de bioterio convencional.

4.5 PARÁSITOS GASTROINTESTINALES MÁS COMÚNMENTE ENCONTRADOS EN LOS RATONES DE BIOTERIO CONVENCIONAL

4.5.1 *Giardia muris*

Son protozoarios pertenecientes a la orden Diplomonadida, familia Hexamitidae. Los trofozoitos, es decir, la forma activa del parásito son piriformes, poseen un disco de succión ventral; ocho flagelos y dos axostilos delgados, además de, un par de núcleos centrales. Mide entre 7 a 13 μ de largo y de 5 a 10 μ de ancho (14) (Fig. 4). Este parásito se encuentra principalmente en la porción anterior del intestino delgado de ratones, ratas y hámster. La cepa BALB/c es la más resistente a la infección con estos parásitos.

El ciclo de vida que presenta es directo, los trofozoitos se adhieren al intestino mediante el disco de succión y absorben los nutrientes. La reproducción es por fisión binaria, es decir, un adulto se parte en dos para producir dos células hijas. Conforme avanzan en el tracto gastrointestinal atraviesan por un proceso de enquistación para resistir al medio ambiente una vez fuera del huésped, los quistes son el estado infectivo de este parásito (14), son elipsoidales de 15 X 17 μ tienen una pared delgada y 4 núcleos, se hallan en los intestinos y heces (15), el contagio ocurre por la ingestión de los quistes, sin embargo algunas veces la ingesta de trofozoitos también puede infectar al huésped (14). La dosis mínima necesaria para el contagio es de aproximadamente 10 quistes (16), la fisión binaria también puede ocurrir en el quiste; se ha reportado que la excreción de quistes es mayor en los machos (14 y 16).

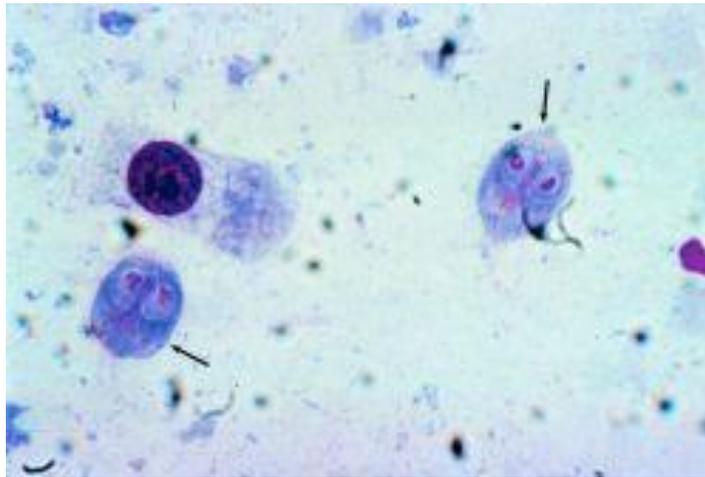


Fig.4 Trofozoitos de *Giardia muris*, fuente: <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com>

La infección con *Giardia muris* es comúnmente asintomática, se observa en casos muy severos o crónicos un incremento en el número de linfocitos intraepiteliales, una pérdida de vellosidades en las células del intestino, reducción de las vellosidades y enteritis crónica (en estudios histológicos), además de que puede llegar a diseminarse por todo el organismo vía sanguínea, en caso de ser capaz de romper la pared de los vasos sanguíneos del intestino (en casos extremadamente severos). Los signos que llegan a observarse son inespecíficos como pérdida de peso, retraso del crecimiento, pelo hirsuto y alargamiento del abdomen, sin embargo pueden presentar diarrea y enteritis crónica (16 y 17). Finalmente en un caso muy extremo se encontrarán cadáveres dentro de la caja. El diagnóstico se realiza por el método de Flotación y Faust (14 y 15). No se conoce un tratamiento que elimine por completo este parásito, sin embargo, el metronidazol elimina la infección en un 58.3% (14).

La manera más eficaz de controlar esta infección es eliminando a los animales que obtuvieron resultados positivos, de la colonia o derivar por cesárea (13). Para

la desinfección del alimento y las instalaciones se sugieren la radiación con luz ultravioleta y los desinfectantes con base de cloro (14).

4.5.2 *Hymenolepis nana*

Anteriormente ***Rodentolepis nana***: Pertenecientes a la familia de los cestodos, es decir gusanos largos y planos; miden de 20 a 40 mm de largo y 1 mm de ancho, por lo que son conocidos como la “lombriz plana enana”, son de color blanco. Poseen 4 ventosas en el escólex y el róstelo esta armado con un anillo simple con 20 a 30 pequeños ganchos (14 y 15), debajo del escólex tiene un diminuto cuello y de él se desarrollan los proglótidos (18); este se dividirá hasta en 200 segmentos (17). Los proglótidos maduros son trapezoidales y están provistos con 3 testículos esféricos, un ovario y una glándula vitelina ramificada, todos los segmentos poseen un solo poro genital y los más lejanos al escólex podrán observarse ya sea lleno de huevos o completamente vacíos por la descarga de estos (15) (Fig.5). Los huevos son transparentes, ovalados y miden 30 a 55 μ X 44 a 62 μ , el embrión es esférico, con una pared delgada que lo rodea la cual termina en bulto en cada extremo(14,15 y 17) del cual salen 6 delgados filamentos(14 y 15), el embrión posee tres pares de pequeños ganchos (14,17 y 18). Los huevos son depositados en la luz del intestino delgado y excretados por las heces.

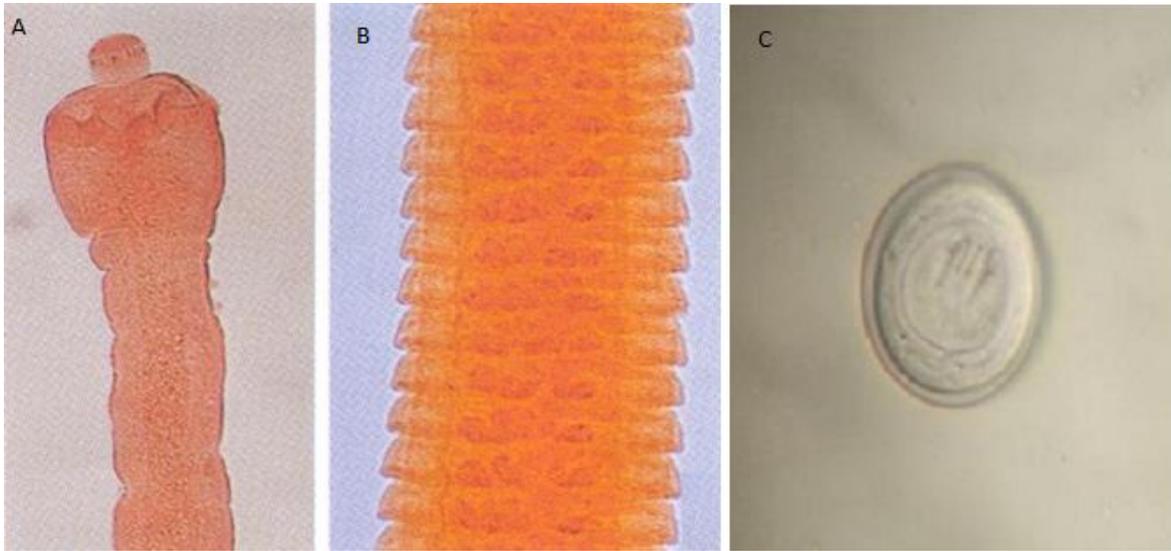


Fig. 5 *Hymenolepis nana* A) Adulto acercamiento del escólex, fuente: <http://atlas.or.kr/>, B) Segmentos , fuente: <http://atlas.or.kr/> y C)Huevo.

El ciclo de vida puede ser directo o indirecto, en el primer caso un ratón consumirá las heces de otro ratón infestadas de huevos lo cual provocara que, después de pasar al estómago, el huevo se abra en el intestino delgado, la larva penetra en la vellosidad intestinal formando un cercoquiste a los 4 días (14,15 y 16), después regresa al lumen intestinal y se adhiere a la mucosa donde se desarrollará en un adulto a los 11 días. En la necropsia también ha sido posible encontrar parásitos adultos en los ductos biliares y pancreáticos. El ciclo indirecto involucra la participación de un gorgojo (*Tribolium confusum*) (Fig. 6), una pulga (*Xenopsylla cheopis*) o cucaracha (*Blatta orientalis*), el cual ingiere los huevos y estos abren en el estómago del insecto, el embrión utiliza sus 3 pares de ganchitos para abrirse camino a otra cavidad del insecto, en especial al hemocele donde se desarrolla a cercoquiste; para que termine su desarrollo es necesario que el insecto sea ingerido por el huésped definitivo, el ciclo indirecto toma de 20 a 30 días (14,15 y 18).



Fig. 6 Gorgojo, fuente: <http://www.pbase.com/>

La infección se considera subclínica excepto los casos crónicos o severos en los que se podrá observar, pérdida de peso, retraso en el crecimiento, obstrucción intestinal, impactación de las heces, sin embargo en las crías se puede observar el ano manchado lo que es indicativo de diarrea. Las lesiones encontradas son enteritis catarral y abscesos en los linfonodos mesentéricos (14,15,17 y 18). El diagnóstico se realiza mediante la técnica de Flotación o de Faust, también observando a los adultos en la necropsia. El tratamiento es raramente indicado, pero se administra Prazicuantel 35mg/kg dosis única (14) o dos dosis de 5-10mg/kg espaciados por 10 días (14 y 17), Mebendazol 1 g/kg de alimento(19 y 17).

4.5.3 *Hymenolepis diminuta*

Conocida como la “lombriz plana de la rata”, se diferencia de *Hymenolepis nana* por su tamaño, el escólex, el tamaño de sus huevos y el ciclo de vida (Fig. 7). Este parásito mide de 20 a 60 mm X 3 a 4 mm, el escólex tiene forma de pera y no posee ganchos; el huevo es casi esférico y mide de 62 a 88 μ X 52 a 81 μ (14 y 17), la membrana externa es de color más oscuro que los de *Hymenolepis nana* y

pueden estar estriados (17), este embrión no posee filamentos, los huevos son más resistentes llegando a sobrevivir en las heces del ratón por 6 meses (14).

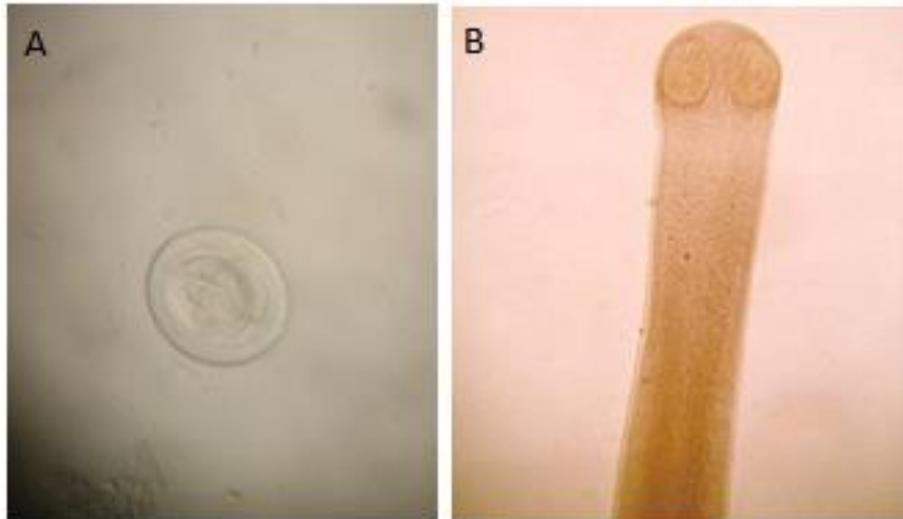


Fig. 7 *Hymenolepis diminuta* A) Huevo, B) Verme en estado adulto, fuente: <http://es.wikipedia.org/>

Este parásito puede infectar a las ratas, ratones, humanos, etc.; forzosamente requiere que un insecto ingiera el huevo para poder realizar su ciclo de vida, preferentemente un gorgojo o una pulga y seguirá el mismo mecanismo que *Hymenolepis nana*, el adulto se puede apreciar en intestino de 19 a 21 después de ingerir el insecto (14 y 17). La infección suele ser subclínica, en los casos graves provoca enteritis catarral, enterocolitis con hiperplasia linfoide además de un incremento en la permeabilidad intestinal (14); por lo tanto podrá observarse diarrea, pérdida de peso y en contadas ocasiones ratones con emaciación y finalmente muerte (17). El tratamiento que se sugiere es el mismo que se utiliza para *Hymenolepis nana*, sin embargo, de nuevo la manera más eficaz es la eliminación de los sujetos infectados y la derivación por cesárea (14). Ambas pueden ser consideradas zoonóticas aunque se requiere forzosamente de la ingestión del insecto infectado por parte del humano (14).

4.5.4 *Syphacia muris*

Son gusanos de color blanco cilíndricos y tanto la boca como la cola son puntiagudos, el macho mide de 1.2 a 1.3 mm de largo y 100 μ de ancho, la cola se dobla ventralmente, el macho además tiene una sola espícula larga y prominente y un gubernaculum. La hembra mide 2.4 a 4 mm de largo, posee la vulva en el cuarto anterior del cuerpo (14) ambos sexos poseen el esófago de forma bulbar y la región cervical es pequeña (16). Los adultos (Fig.7) habitan tanto en el ciego como en el colon, las hembras depositan los huevos en la zona perianal del huésped, tiene periodicidad para la postura la cual se presenta sobre todo en la tarde (14). El huevo tiene la forma de un plátano mide 72 X 82 μ de largo y 25 a 36 μ de ancho (Fig.8), la infección es directa se presenta cuando un ratón ingiere las heces de otro infectado, al olisquear la zona perianal de otro ratón o por la contaminación del alimento, agua o cama (16), sin embargo se trata de huevos extremadamente ligeros por lo que incluso podrían volar de una caja a otra contagiando así a ratones de la misma habitación (16). Al ser ingerida la larva migra hacia el intestino grueso y madura en él, el periodo prelatente es de 7 a 8 días (14) y los huevos pueden permanecer activos hasta por 4 semanas en una superficie contaminada (14).



Fig. 8 *Syphacia muris* A) Adulto, fuente: <http://ircmj.com/>, B) Huevos fuente: <http://ircmj.com>

Se considera infección no patogénica, sin embargo se observa la pérdida de peso como signo clínico. El diagnóstico se realiza por técnica de Graham, o en la necropsia se observara una gran cantidad de adultos en el ciego del animal (13,14 y 19). Se considera un parásito difícil de eliminar se recomienda la administración de alimento mezclado con Fenbendazol (150 mg/kg de alimento) por 2 semanas, este ha probado ser eficaz tanto para formas adultas como para huevos. El control se realiza mediante la adecuada sanitización del alimento e instalaciones y derivación por cesárea (14,15 ,19 y 20) para evitar el contagio caja a caja se recomienda el uso de filtros (19), los huevos pueden inactivarse con Etanol al 70% o con calor de 80°C por 30 minutos (16 y 17).

4.5.5 *Syphacia obvelata*

Es el oxiuro más común en los roedores infectando a ratas, ratones y jerbos; son similares a los anteriores (Fig.8), los machos miden de 1.1 a 1.5mm de largo y de 120 a 140 μ , con una larga espícula y gobernaculum, la porción anterior tiene pequeñas alas cervicales y la cola se dobla ventralmente, posee 3 proyecciones circulares (mamelones) en la superficie ventral, las hembras miden de 3.4 a 5.8 mm de largo y de 240 a 400 μ de ancho, se encuentran comúnmente en el ciego y en el colon, ambos sexos poseen tres labios el esófago posee una porción pre bulbar y un bulbo globular posterior, así como pequeñas alas cervicales(17 y 18) (Fig.9). Los huevos miden de 111 a 153 μ de largo X 33 a 55 μ de ancho, son ovalados como un plátano pequeño (14) (Fig. 9) considerado uno de los parásitos más comunes de los animales de laboratorio siendo considerada también una zoonosis.



Fig.9 *Syphacia obvelata* A) Adulto fuente: <http://ircmj.com/>, B) Acercamiento del Bulbo globular y alas cervicales, C) Huevo

El ciclo de vida es directo, momentos después de la fertilización el macho muere y se elimina por las heces, la hembra grávida (Fig. 10) migra hacia el ano y deposita los huevos en la región perianal del huésped 12 días después de la fertilización, donde crece el embrión en cuestión de horas; la hembra entonces se seca y muere (18). Al igual que *S. muris*, esta especie también ingresa al huésped por agua, alimento, cama contaminada o por la ingestión de heces, también son muy ligeros por lo que pueden infectar cajas vecinas o incluso hallarse en el ambiente del Bioterio (19), los huevos son altamente infecciosos siendo posible encontrarlos viables en cinta adhesiva por 42 horas a temperatura ambiente o hasta por 14 días a temperaturas menor de 5°C (14) Ambas especies tienen preferencia por edad y sexo siendo más susceptibles los machos de 5 a 6 semanas (16 y 19).



Fig. 10 Sección de hembra de *Syphacia obvelata* grávida

Considerada usualmente como subclínica, en casos severos o crónicos se puede observar impactación fecal, pérdida de peso, pelo hirsuto, prolapso rectal, irritación de la zona perianal y enteritis catarral. Las paredes de la caja se podrán observar manchadas con heces debido a la comezón producida a los animales (13,14,18 y 20). El diagnóstico es idéntico al de *S. muris*, así como, su tratamiento.

Para combatir estas infecciones parasitarias, es necesario conocer y escoger el fármaco que sea más confiable en cuanto a la seguridad que presente para eliminar al parásito y no dañar al ratón.

4.6 FÁRMACOS UTILIZADOS CONTRA PARÁSITOS

GASTROINTESTINALES EN RATONES.

Dentro de los fármacos utilizados como desparasitantes se tiene una clasificación de familias, las cuales se desglosan a continuación

4.6.1 Benzimidazoles.

Son una familia de Cesticidas utilizados como desparasitantes desde la década de 1950; además presentan una actividad antimicótica, antineoplásica (21), antiinflamatoria, antipirética y analgésica (22). El mecanismo de acción de esta familia es similar en todos sus miembros, presentan los siguientes efectos sobre el parásito.

- En el citoesqueleto a nivel de la proteína tubulina b, evitan su polimerización a microtúbulos, sin afectar la síntesis de estos en las células del huésped (23).
- Bloquean el paso de glucosa desde el intestino del parásito a su sistema general, provocando un déficit energético.
- Interfieren en la síntesis de DNA y lo degrada.
- Inhiben la reductasa de fumarato limitando la utilización de la glucosa ya presente en el parásito, por lo que éste muere por inanición (22).
- Afectan la morfología de los huevos y evita la eclosión de la larva (24).

Estos desparasitantes tienen un amplio espectro y margen de seguridad, actúan contra nematodos, cestodos y trematodos, tanto en la fase larvaria como en huevo.

Presentan baja solubilidad en agua, lo que limita su absorción por vía gástrica y por tanto su distribución. Tienen baja toxicidad para los mamíferos, pero algunos de sus efectos adversos incluyen vómito, anemia, prurito, diarrea y teratogenicidad en ratas gestantes (21).

Esta familia incluye Tiabendazol, Mebendazol, Fenbendazol, entre otros.

4.6.2 Niclosamida.

Es un desparasitante derivado del ácido salicílico que afecta únicamente a cestodos adultos.

Su mecanismo de acción produce

- Inhibición de la absorción de glucosa
- Altera los procesos del metabolismo mitocondrial y el ciclo de Krebs. (21 y 23)
- Ataca el escólex y los anillos por lo que el parásito se desintegra y se digiere.(22)

Administrado por vía oral se considera poco toxica porque no se absorbe en el intestino, si se utiliza una vía parenteral puede causar hipertermia, hiperventilación, taquicardia, convulsiones violentas y muerte rápida (21)

4.6.3 Prazicuantel.

Es un derivado de la pirazina isoquinolica, se trata de un polvo blanco soluble tanto en agua como en alcohol, por vía oral su absorción es rápida y completa en el intestino, distribuyéndose a todos los tejidos (músculo , cerebro, etc.) atravesando pared intestinal y barrera hematoencefálica. No se ha detectado su exacto mecanismo de acción (21), ataca trematodos y cestodos, eliminando tanto a larvas como adultos, in vitro produce:

- Alteración y estimulación en el movimiento parasitario ocasionando contracciones tetánicas en su musculatura, probablemente se deba a un aumento en la permeabilidad de la membrana celular al calcio (23).
- Bloquea la síntesis de ATP.
- Provoca vacuolizaciones focales irreversibles, con lo que se desintegra el tegumento por lo que el parásito puede ser digerido (21 y 22).

Puede provocar anorexia, vomito, salivación excesiva, letargia y diarrea. No posee efectos adversos sobre el desarrollo fetal (23)

4.6.4 Metronidazol.

Derivado del nitrotiazol este antibiótico es utilizado también contra las infecciones por Giardia. Ataca bacterias anaerobias produciendo compuestos metabólicos inestables y radicales libres que se conjugan con el DNA y bloquean su síntesis, induciendo a la muerte celular (21 y 24). En protozoarios se desconoce el mecanismo de acción, se cree que provoca rupturas en la membrana celular. No

parece tener efectos adversos, sin embargo en casos aislados se reportaron temblores y ataxia (23).

4.6.5 Ivermectina.

Desparasitante de amplio espectro que posee una acción tanto en los adultos como en las larvas de nematodos, cestodos y artrópodos. Pertenece a la familia de las Avermectinas, sintetizada a partir de *Streptomyces avermitilis*.

Los efectos que produce son.

- Aumenta la liberación del neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico (GABA), en las terminaciones nerviosas de los parásitos, lo que impide la transmisión de impulsos nerviosos, inmovilizándolos (22).
- Aumenta la permeabilización de los canales de cloro de la membrana celular provocando parálisis flácida (23 y 24).
- Interfiere en la reproducción de los artrópodos y en la postura de huevo (21 y 23)

Posee una alta afinidad por la grasa corporal, lo que aumenta la persistencia en el organismo y su gran periodo de protección, su toxicidad es baja, sin embargo dentro de los efectos secundarios se presentan ataxia, midriasis y coma.

Es un fármaco susceptible a la luz ultravioleta por lo que debe almacenarse en frascos ámbar.

Algunos fármacos y numerosas enfermedades infecciosas entre las que se encuentran las enfermedades parasitarias, pueden producir cambios estructurales en los órganos, los que en ocasiones son responsables de la signología que presenta el animal, por ejemplo como se explicó anteriormente, la diarrea puede ser provocada por una disminución o eliminación de las micro vellosidades en el intestino delgado, sin embargo este cambio en el tejido no es observable sino a nivel microscópico.

4.7 Estudio histopatológico.

En la práctica profesional de un Médico Veterinario dedicado al diagnóstico de enfermedades, es común la recolección y el envío de muestras para su estudio, el cual puede ser virológico, serológico o histopatológico (25). Este último resulta muy importante porque nos permite observar la morfología que presentaba el tejido y las células del mismo, al momento de realizar la toma de muestra, se procurará que para la correcta observación de este tejido se presente de la manera más fiel posible a como se podría encontrar en el organismo del animal; se podría entonces observar la presencia de células inflamatorias, la irritación presente en las células, el grado de alteración que éstas pudieran presentar, si además existe la posibilidad de que otro agente patogénico esté involucrado, así como, el grado de reparación que presenta el tejido.

Para que sean posibles estas observaciones se sigue una serie de reglas establecidas con este fin.

1.- La más importante es elegir el órgano o tejido a observar, en el caso de parásitos gastrointestinales principalmente órganos del sistema digestivo, después se realizará una evaluación de otros órganos si la signología nos demuestra que es necesario, ej.: los cisticercos de *Taenia solium* pueden encontrarse en el encéfalo (25 y 26)

2.-Escoger el tipo de observación que se requiere (25) ya sea al microscopio fotónico (Fig. 11) o electrónico (sin embargo las observaciones con este microscopio se realizan para estudios mucho más específicos como las enfermedades virales o genéticas en las que se requiere emplear un mayor aumento y una mayor resolución).



Fig. 11 Microscopio fotónico, fuente: <http://grupo-icb.com/>

3.- Extraer los tejidos y colocarlos en el líquido fijador (generalmente formaldehído 10%) tan rápido como se pueda ya sea de un cadáver o en su caso una biopsia de un animal vivo, para evitar los cambios autolíticos que se presentan, inactivar el

agente infeccioso encontrado en el tejido y mantener el mayor tiempo posible la apariencia de las estructuras al momento de su obtención (26, 27 y 28).

4.- Se realiza la deshidratación, con el fin de eliminar el agua presente y poder sustituirla con otra sustancia como la parafina la que nos permite mantener aún más la morfología que presentaba la célula, ésta se realiza sumergiendo el tejido en alcohol a diferentes grados hasta llegar al alcohol absoluto, este proceso tarda alrededor de 16 horas en completarse (26, 27 y 28).

5.-El aclaramiento es un proceso por el que se sustituye el alcohol con otro solvente que se pueda mezclar tanto con el mismo alcohol como con parafina, usualmente se utiliza xilol, de igual manera se realizan cambios sucesivos de alcohol por xilol hasta llegar a el xilol puro y la mezcla de xilol con parafina. (25, 26, 27 y 28).

6.- A la mezcla de parafina y xilol seguirá la inclusión en parafina pura, el fin es que la parafina llene los espacios antes ocupados por el agua, generalmente se realiza en un molde de 2.5cm (Fig. 12), en el que el tejido se sumerge por completo (25, 26 27 y 28).



Fig. 12 Bloque de parafina con tejido fuente: <http://www.virtualpathology.leeds.ac.uk/>

7.- Se procede a realizar los cortes del tejido por medio de un aparato llamado micrótopo (Fig. 13). Este cuenta con una cuchilla extremadamente afilada que nos permite cortes tan finos como 1μ , sin embargo los cortes para microscopio fotónico requeridos son de $5-10\mu$ (25, 26, 27 y 28), la máquina realizará los cortes seguidos, como una cinta continua; esta cinta se deja flotar en agua y con un portaobjetos se capturan los cortes del tejido.



Fig. 13 A) Microtómo, B) Proceso de recolección de cortes fuente: <http://nmnwse.org/>

8.- Para poder teñir los cortes se someten a calor ligero, lo que eliminara el exceso de parafina y posteriormente se le añade el colorante, el método más utilizado es el de Hematoxilina y Eosina (HE) en el que las estructuras citoplasmáticas se tiñen de color rosa y el núcleo de color azul (26 y 28).

9.- Por último después de la tinción, se sumergirán los cortes en recipientes con alcohol en diferentes grados y xilol, después se le agrega una gota de resina de montaje transparente y un cubre objetos lo que nos asegura su protección (26, 27 y 28). Para ser observados posteriormente por el patólogo.

En este experimento además de probar la eficacia de la flor de Cempazúchitl como antidiarréico y desparasitante, se pretende comprobar su seguridad, es

decir, que no cause irritación ni lesión del tejido de ningún órgano del sistema gastrointestinal. Por esta razón además de realizar el estudio histopatológico que permitirá observar las estructuras del sistema gastrointestinal más detalladamente, también se observó la actividad biológica del extracto acuoso de la flor de Cempazúchitl, aunque no fuéramos capaces de observar la sustancia por sí misma, sin embargo si posee una buena actividad biológica será efectivo contra los parásitos y podrá aminorar la motilidad intestinal sin causar un efecto toxico en los individuos para lo cual se realizó un experimento previo conocido como prueba de toxicidad con *Artemia salina*.

5. PROCESO EXPERIMENTAL.

Todos los experimentos fueron realizados en el Bioterio de la Facultad de Química, siguiendo la NOM- 062- ZOO -1999 y las buenas prácticas de manejo del uso de animales de laboratorio.

5.1 EXPERIMENTO 1: PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA EN ARTEMIA SALINA

El ensayo de letalidad de *Artemia salina* (29) se basa en la posibilidad de causar la muerte de larvas de este crustáceo cultivadas en el laboratorio. Este método fue propuesto por Michael en 1956 y posteriormente, desarrollado por Vanhececke (1981), Sleet y Brendel (1983) con el propósito de contar con una herramienta útil y sencilla para la determinación de toxicidad. Este método, en el cual se determina el valor de la concentración letal media (CL50) de compuestos y extractos en medio salino, se realiza aplicando el antilogaritmo de la concentración obtenida en

la gráfica de acumuladas (vivas/muertas). Este ha sido utilizado para la detección de toxinas de hongos y cianobacterias, toxicidad de extractos de plantas, metales pesados y para predecir citotoxicidad de compuestos puros (29).

Se empleó agua de mar artificial la cual fue preparada de acuerdo a la siguiente fórmula: para 1L, en agua destilada se disolvieron 23 g de NaCl, 11 g de MgCl \cdot 6H $_2$ O, 4 g de Na $_2$ SO $_4$, 1.3 g de CaCl $_2$ \cdot 2H $_2$ O y 0.7 g de KCl, se ajustó el pH de la solución a 8.0 con Na $_2$ CO $_3$.

Para la eclosión de los huevos, se utilizó una cámara de vidrio de 2 compartimentos (uno oscuro y el otro iluminado por una lámpara de 18 W que se colocó en una altura aproximada de 30 cm) (Fig. 14). El agua salina, se esteriliza, se oxigena por 15 minutos previos a la colocación de los huevos. Se agregaron 0.1 g de huevos por cada litro de agua de mar artificial. Se mantuvo la aeración constante mediante una bomba, la temperatura de 28°C y el pH=9.0 durante el tiempo de incubación para garantizar la eclosión de los crustáceos (48 h)



Fig. 14 Cámara de vidrio.

Para la determinación de la concentración letal al 50 % (CL50), se organizaron grupos con 10 nauplius y por triplicado para cada uno de ellos, de la siguiente manera.

Grupo 1. Control positivo. $K_2Cr_2O_7$, concentraciones: 1, 10, 100 y 1000 ppm

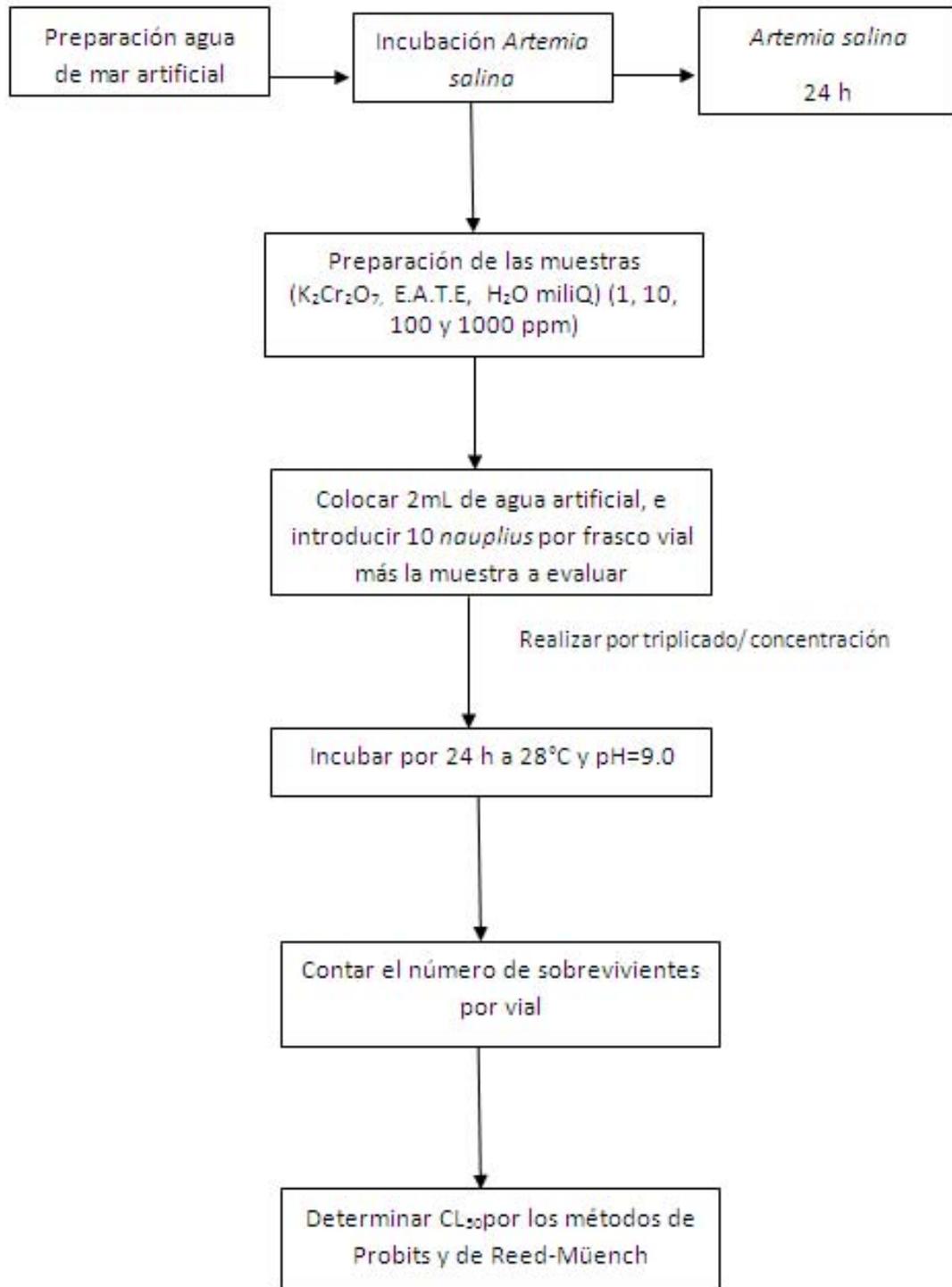
Grupo 2. Control Positivo Extracto Acuoso de flor de Cempazúchitl, concentraciones: 1, 10, 100 y 1000 ppm .

Se incubaron por 24h (Fig. 15) finalizado el tiempo se contaron el número de sobrevivientes. Con los datos obtenidos se realizaron las gráficas correspondientes para cada muestra y se determinó la CL50 usando los métodos de Probit y de Reed-Müench para el análisis de los datos obtenidos (29).



Fig. 15. Incubación *Artemia salina*

5.1.1. Diagrama de flujo. Experimento 1. Prueba de Toxicidad aguda en *Artemia salina*



5.2 EXPERIMENTO 2: EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIDIARREICO DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA FLOR DE CEMPAZÚCHITL.

SUJETOS DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron 48 ratones macho de la cepa CD1 de 25-40 g, los cuales estaban sometidos a ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, a los que se les alimentaba con LabChow® a libre acceso y agua ozonificada. Estos se encontraban protegidos bajo la norma NOM-062-ZOO-1999 (30).

MATERIAL Y MÉTODOS.

- Jeringas de 1mL de capacidad con agujas calibre 27.
- Cajas de acrílico transparentes con tapa.
- Rejilla de alambre
- Balanza granataria digital para pesar animales de laboratorio
- Cronómetro
- Tabla cubierta con corcho
- Sondas esofágicas para ratón
- Regla de 40 cm
- Marcadores indelebles
- Hojas de papel de estraza
- Estuche de disección (31)

Reactivos:

- Solución de metilcelulosa al 2%
- Solución de carbón activado en agua ozonificada al 3%
- Tabletas comerciales de Loperamida (Lomotil) de 2mg.
- Extracto Acuoso de *Tagetes erecta*

5.2.1 Procedimiento.

Se preparó el extracto acuoso de *Tagetes erecta* mediante infusión, utilizando 250mL de agua miliQ, la cual se calentó hasta la ebullición. Se pesaron y maceraron 50g de la planta completa (hojas, flor, tallo y raíz) (Fig.16), el producto obtenido se envolvió en gasa estéril formando una bolsa que fue sumergida en el agua miliQ en ebullición y se dejó hasta que alcanzó la temperatura ambiente. Se obtuvo una concentración de 10 mg/mL



Fig. 16. Proceso de elaboración del extracto acuoso de la flor de Cempazúchitl. A) Pesaje y B) Maceración del total de la flor, C) Extracto terminado

Posteriormente los ratones fueron pesados y marcados, y se dividieron de forma aleatoria en 8 grupos con una $n=6$, los cuales fueron identificados de la siguiente forma:

Grupo 1: Control de metilcelulosa al 2% (CTRL), grupo 2: carbón activado (CA), grupo 3: Loperamida 0.25mg/kg (LOP 0.25), grupo 4: Loperamida 2.5mg/kg (LOP 2.5), grupo 5: Loperamida 25mg/kg (LOP 25), grupo 6: Extracto acuoso de flor de Cempazúchitl 0.25mg/kg (CEM 0.25), grupo7: Extracto acuoso de flor de Cempazúchitl 2.5mg/kg (CEM 2.5) y grupo 8: Extracto acuoso de flor de Cempazúchitl 25mg/kg (CEM 25)

Se utilizó la técnica de tránsito gastrointestinal por ingestión de carbón (31, 32 y 33), y se realizaron los cálculos para obtener las dosis deseadas de 0.25, 2.5 y 25 mg/kg. la administración se realizó a razón de 0.1mL/10g de peso a cada ratón por sondeo esofágico (Fig. 17); previa privación de alimento por 12h.



Fig. 17 Sondeo esofágico.

Las dosis se calcularon mediante la siguiente ecuación:

$$\left(\frac{25\text{mg}}{1000\text{g}}\right)\left(\frac{10\text{g}}{0.1\text{ml}}\right) = \frac{250}{100} = 2.5\text{mg/ml}$$

Los cálculos para cada dosis se describen a continuación:

$C_1V_1=C_2V_2$ donde:

C_1 : Es la concentración inicial de nuestro extracto (10mg/mL)

V_1 : Es el volumen necesario para administrarle al ratón, el cual tendrá la concentración de 25mg/kg.

C_2 : Es la concentración obtenida para administrarle 0.1mL/10g de peso a cada ratón.

V_2 : El volumen que se necesitó preparar para poder administrarle al total del grupo. El cual se obtuvo sumando los pesos de los ratones de cada grupo. Se necesitaban aproximadamente 2.5mL para cada grupo, pero para efectos prácticos se realizó el doble del volumen en caso de presentarse algún imprevisto.

Por lo tanto los cálculos son los siguientes:

a) *Tagetes erecta* 2.5 mg/mL (a dosis de 25 mg/kg)

$$C_1V_1 = C_2V_2 \therefore V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1} \rightarrow V_1 = \frac{(2.5\text{ mg/mL})(5\text{ mL})}{10\text{ mg/mL}} = \frac{12.5}{10} = 1.25\text{ mL}$$

Fueron necesarios 1.25 mL del extracto acuoso lo que indico que se necesitaron 3.75 mL de agua ozonificada (la proporcionada normalmente a los animales).

b) *Tagetes erecta* 0.25 mg/mL (dosis de 2.5mg/kg).

$$C_1V_1 = C_2V_2 \therefore V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1} \rightarrow V_1 = \frac{(0.25\text{mg/mL})(5\text{mL})}{2.5\text{mg/mL}} = \frac{1.25}{2.5} = 0.5\text{ mL}$$

Por lo que se necesitaron 4.95 mL de agua ozonificada

c) *Tagetes erecta* 0.025 mg/mL (dosis de 0.25 mg/kg)

$$C_1V_1 = C_2V_2 \therefore V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1} \rightarrow V_1 = \frac{(0.025\text{mg/mL})(10\text{mL})}{0.25\text{mg/mL}} = \frac{0.25}{0.25} = 1\text{ mL}$$

Se necesitaron 9 mL de agua ozonificada.

Posteriormente para preparar las dosis de Loperamida se necesitó macerar 2 tabletas en 1mL de agua ozonificada para obtener una concentración de 4 mg/mL ya que, como se observó en los cálculos para *Tagetes erecta*, se necesitaron 2.5 mg/mL para cumplir con la dosis de 25 mg/kg.

Por lo tanto los cálculos que se realizaron fueron:

a) Loperamida 2.5 mg/mL (dosis de 25mg/kg)

$$C_1V_1 = C_2V_2 \therefore V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1} \rightarrow V_1 = \frac{(2.5\text{mg/mL})(5\text{mL})}{4\text{mg/mL}} = \frac{12.5}{4} = 3.12\text{mL}$$

Y se agregaron 0.88 mL de agua ozonificada.

b) Loperamida 0.25 mg/mL (dosis de 2.5 mg/kg)

$$C_1V_1 = C_2V_2 \therefore V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1} \rightarrow V_1 = \frac{(0.25 \text{ mg/mL})(5 \text{ mL})}{2.5 \text{ mg/mL}} = \frac{1.25}{2.5} = 0.5 \text{ mL}$$

Por lo que se debió agregar 4.95 mL de agua ozonificada.

c) Loperamida 0.025 mg/mL (dosis de 0.25 mg/kg)

$$C_1V_1 = C_2V_2 \therefore V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1} \rightarrow V_1 = \frac{(0.025 \text{ mg/mL})(10 \text{ mL})}{0.25 \text{ mg/mL}} = \frac{0.25}{0.25} = 1 \text{ mL}$$

Por lo que se agregaron 9 mL de agua.

La prueba de hipótesis que se planteó fue la siguiente:

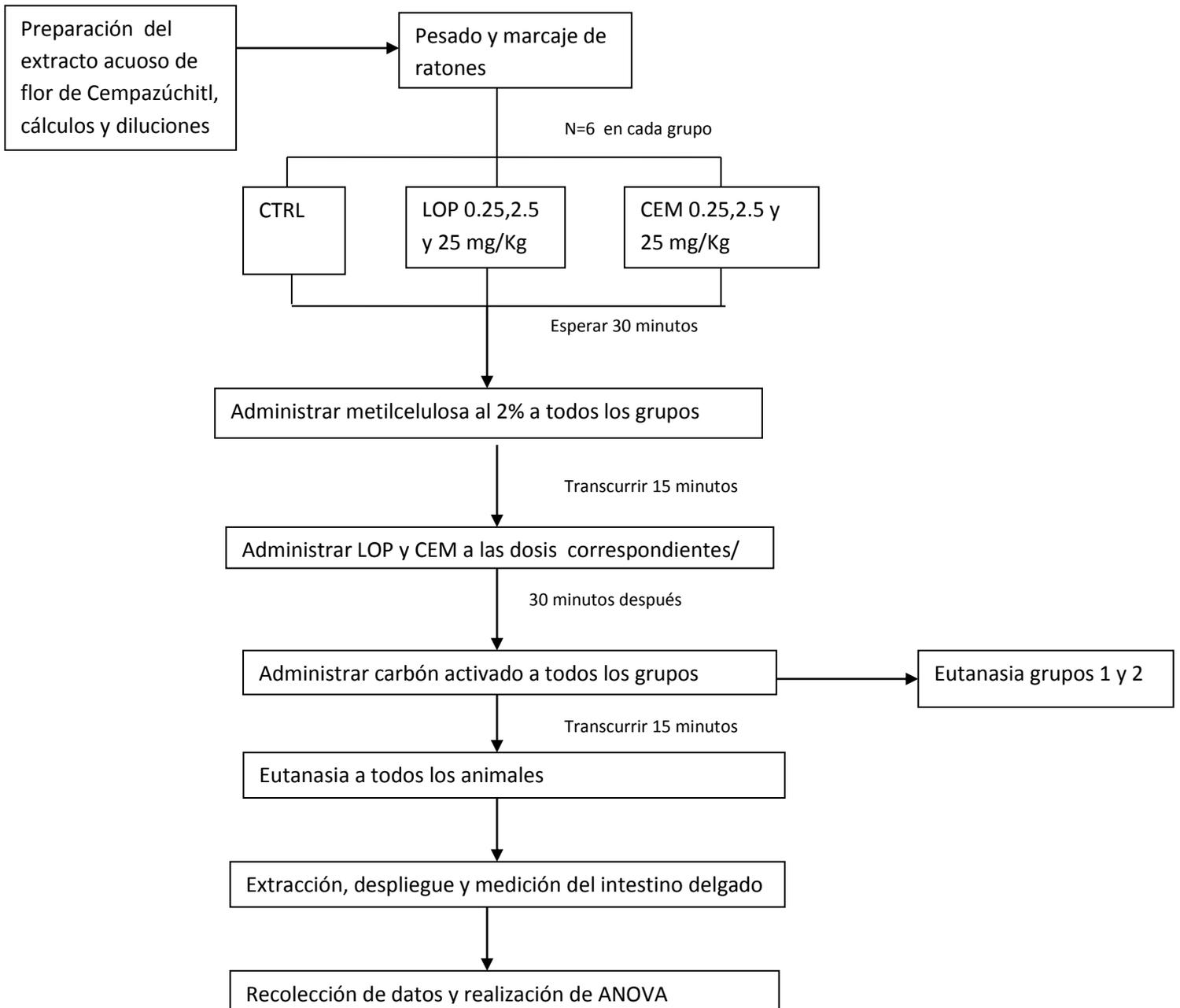
H₀: efecto antidiarréico de la Loperamida = al efecto antidiarréico del extracto acuoso de la flor de cempazuchitl

H₁: El efecto antidiarréico de la Loperamida ≤ al efecto antidiarréico del extracto acuoso de la flor de cempazuchitl.

Se inició el experimento previa administración de metilcelulosa al 2% a todos los grupos 30 minutos después se administró los tratamientos correspondientes para cada grupo. Después de 15 minutos se administró 0.25mL de la solución de carbón activado al 3% a todos los grupos Para el grupo 1 y dos que son nuestros controles positivos fueron sacrificados a los 30 minutos post-administración. Una vez pasados 30 minutos a los animales de los grupo 3 al 8 se les realizó la eutanasia utilizando la cámara de CO₂ y previa confirmación realizando

dislocación cervical. Se extrajo el intestino delgado de todos los animales hasta el recto, se desplegó sin lesionarlo y se colocó sobre el papel de estraza. Se midió la longitud total del intestino delgado, desde el esfínter pilórico hasta el ciego, considerándose como 100%, y la distancia recorrida por el carbón activado, esto para encontrar el porcentaje del intestino que cubrió el carbón activado en su recorrido y con este dato estimar la eficacia del extracto acuoso. Con los resultados obtenido se realizó un análisis de varianza con el programa Sigma plot, con el objeto de verificar mediante éste si existieron diferencias significativas entre los tratamientos. A continuación se procedió a verificar el efecto desparasitante .

5.2.2. Diagrama de flujo. Experimento 2. Evaluación del efecto antidiarréico



5.3 EXPERIMENTO 3: EVALUACIÓN DEL EFECTO DESPARASITANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA FLOR DE CEMPAZÚCHITL.

SUJETOS DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron 24 ratones macho de la cepa CD1 de 25-40 g, los cuales estaban sometidos a ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, a los que se les alimentaba con alimento LabChow® a libre acceso y agua ozonificada éstos se encontraban protegidos bajo la norma NOM-062-ZOO-1999 (30).

MATERIAL Y MÉTODOS

- Vasos desechables
- Cucharas desechables
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Pipetas Pasteur de plástico
- Chupones para pipeta
- Cinta adhesiva transparente
- Frascos de cristal pequeños
- Tubos falcón de 20mL
- Gradilla
- Centrifuga
- Embudo estéril

- Gasa estéril
- Microscopio fotónico

REACTIVOS

- Solución saturada de cloruro de sodio
- Agua destilada
- Solución de sulfato de zinc al 33%
- Lugol
- Ivermectina 10mg/mL
- Extracto acuoso de *Tagetes erecta* (flor de Cempazúchitl)

5.3.1 Procedimiento

Se utilizó una población de 40 ratones que presentaban un peso de 25 ± 5 g, los cuales fueron separados en 5 grupos de $n=8$ individuos en forma aleatoria; recibieron alimentación ad libitum y agua ozonificada. Los grupos fueron identificados de la siguiente manera:

Grupo 1: control (CTRL), Grupo 2: Ivermectina 0.08 mg/kg (IVER 0.08), Grupo 3: Extracto acuoso de flor de Cempazúchitl 0.08 mg/kg (CEM 0.08), Grupo 4: Ivermectina 0.4 mg/kg (IVER 0.4), Grupo 5: Extracto acuoso de flor de Cempazúchitl 0.4 mg/kg (CEM 0.4)

Se utilizó el extracto acuso previamente preparado para el experimento antidiarreico, como fármaco de comparación se utilizó Ivermectina la cual estaba a una concentración de 10 mg/mL al igual que el extracto acuoso. Se evaluaron siguiendo las dosis de Ivermectina para ratón 0.08 y 0.4 mg/kg (34). Se administró

por sonda esofágica; a razón de 0.1 mL/10 g de peso, por lo que se realizaron los cálculos correspondientes. Primero se realizó la formulación de 0.04 mg/mL para de ella poder derivar la de 0.008 mg/mL.

$$\left(\frac{0.4\text{mg}}{1000\cancel{\text{g}}}\right)\left(\frac{10\cancel{\text{g}}}{0.1\text{mL}}\right) = \frac{4}{100} = 0.04\text{mg/mL}$$

Tanto el extracto Acuoso de *Tagetes erecta* como la Ivermectina fueron sometidos a la siguientes formula (explicada previamente en el experimento 2)

$$C1V1 = C2V2$$

Por lo tanto:

$$C1V1 = C2V2 \therefore V1 = \frac{C2V2}{C1} \rightarrow V1 = \frac{(0.4\text{ mg/mL})(4\text{ mL})}{10\text{ mg/mL}} = \frac{0.16}{10} = 0.016\text{mL}$$

Se redondeó a 0.02 mL los cuales fueron adicionados a 3.98 mL de agua miliQ, como se trataba de un volumen demasiado pequeño para realizarse en un solo paso, se decidió obtener 0.2 mL tanto de Ivermectina como del extracto acuoso agregarlo a 3.8mL de agua, lo cual era llevado a una dilución 1/10 para obtener 0.04 mg/mL.

Después se calculó la dosis de 0.008mg/mL.

$$\left(\frac{0.08\text{ mg}}{1000\cancel{\text{g}}}\right)\left(\frac{10\cancel{\text{g}}}{0.1\text{ mL}}\right) = \frac{0.8}{100} = 0.008\text{ mg/mL}$$

Esta concentración se manejó también para el extracto acuoso, para proceder a su preparación se realizaron los cálculos con lo que se obtuvo.

$$C_1V_1 = C_2V_2 \therefore V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1} \rightarrow V_1 = \frac{(0.008 \text{ mg/ml})(10 \text{ ml})}{0.04 \text{ mg/ml}} = \frac{0.08}{0.04} = 2 \text{ ml}$$

Por lo que se llevó a cabo una dilución 1/10 de la primera formulación (Fig.18).



Fig. 18 Diluciones a 0.4mg/kg y 0.08mg/kg.

La prueba de hipótesis que se planteo fue la siguiente:

H0: El efecto desparasitante de la Ivermectina= al efecto desparasitante del extracto acuoso de la flor de Cempazúchitl

H1: El efecto desparasitante de la Ivermectina \leq al efecto desparasitante del extracto acuoso de la flor de Cempazúchitl.

Posteriormente se realizaron las siguientes pruebas copararasitoscópicas en los 6 grupos:

- **Prueba de Graham:** Consiste en tomar la impresión de la zona perianal de los ratones con una cinta adhesiva transparente, con el propósito de observar los huevos que se hayan quedado unidos en ella, se coloca en un portaobjetos para mirarla al microscopio (35).
- **Prueba de Flotación:** Tiene como fundamento utilizar líquidos con una densidad mayor a la del agua, en los que los huevos de parásitos flotarán. Se toman de 3 a 5 g de heces y se maceran en unas gotas de la solución, posteriormente se agregan de 45 a 100 mL al macerado y se deja reposar por 20 minutos. Finalmente se flamea un asa de alambre y se toma de la superficie 3 gotas de zonas diferentes, las cuales se colocan en un portaobjetos y se observan al microscopio (35).
- **Prueba de Faust:** Se trata de una prueba de flotación por centrifugación, se usa agua destilada para hacer una mezcla homogénea de materia fecal (Fig.19), la cual es centrifugada y decantada en varias ocasiones, al final se le agrega sulfato de zinc y se centrifuga por última vez; por último se realiza una recolección como en una flotación norma (35).

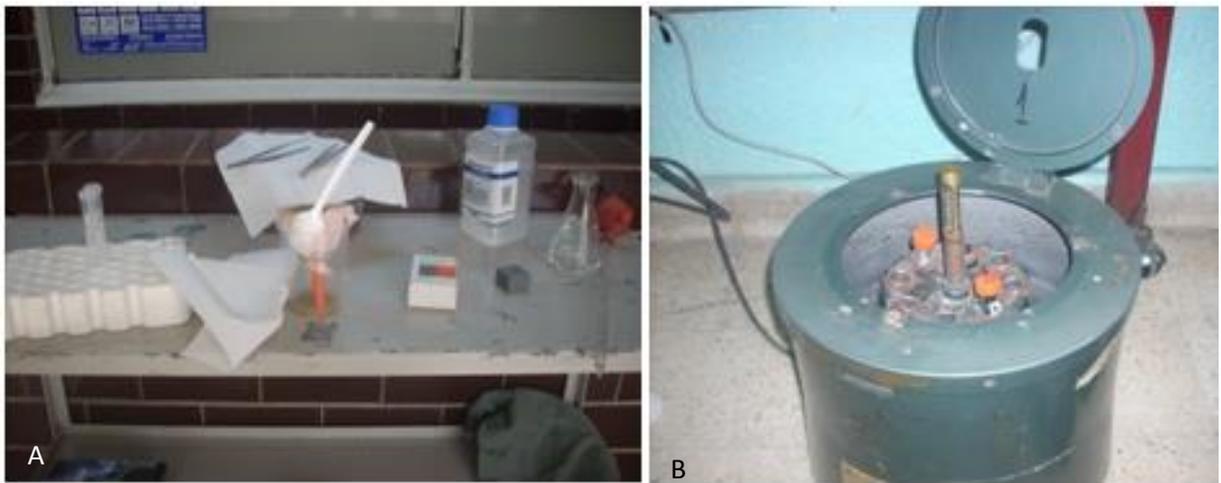


Fig. 19 Prueba de Faust A) Material, B) Centrifugación

Estas pruebas se realizaron en 3 tiempos los cuales son:

- Semana 1: El conteo de todos los grupos previo al tratamiento.
- Semana 2: Cinco días después de la primera administración del tratamiento, en todos los grupos.
- Semana 3: Cinco días después de la segunda administración del tratamiento, en todos los grupos.

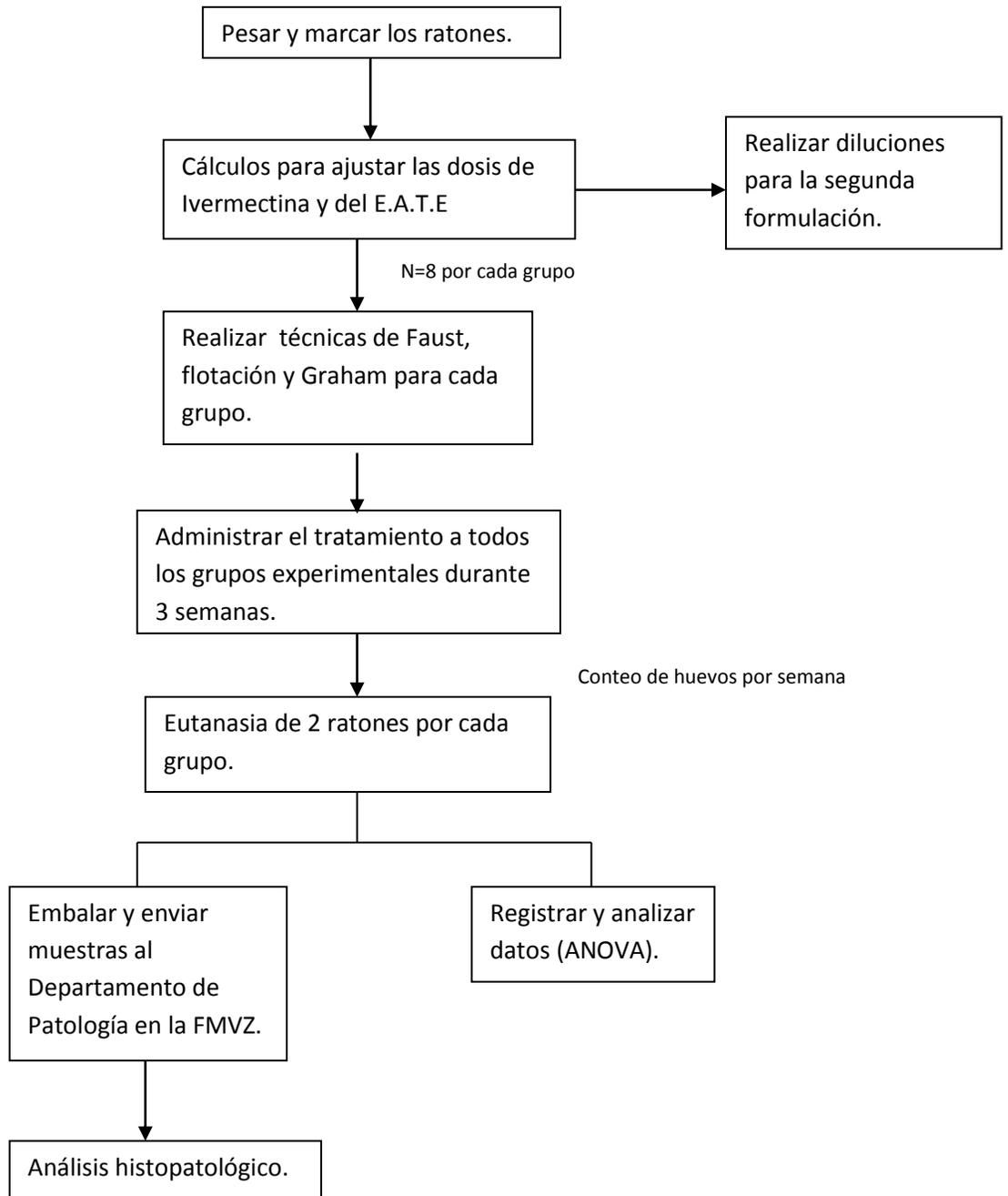
Los animales recibieron su primera administración el mismo día de la primera cuantificación, al día siguiente se revisaba su condición física, estado de alerta, etc. Se les suministró el tratamiento una segunda ocasión 5 días después. Se dejó a los animales en reposo otros 5 días antes de realizarles una última prueba. Después se llevó a cabo el proceso de eutanasia a 2 ratones de cada grupo, mediante cámara de CO₂ y posteriormente una dislocación cervical para confirmar, se extrajeron los órganos del sistema gastrointestinal, desde el esófago hasta el recto, y se preservaron en formaldehído al 10% con su etiquetado correspondiente, con el fin de realizar un examen histopatológico para descartar o demostrar algún daño causado por ambas sustancias en el sistema. Los órganos fueron enviados al Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, donde se realizaron cortes histológicos (Fig.20) y tinción de rutina (Hematoxilina-eosina).



Fig. 20 Proceso de Histopatología A) Órganos en formaldehido, B) Carcasa para cortes histológicos

Al finalizarse recabaron los resultados y se realizó análisis de varianza con el programa de Sigma plot, en caso de que se obtuvieran diferencias significativas con $p < 0.05$ se realizó la prueba post-hoc de Student-Newman-Keuls para determinar diferencia de medias de los grupos con respecto al control.

5.3.2. Diagrama de flujo. Experimento 3. Evaluación del efecto desparasitante.



6. RESULTADOS

A continuación se describen los resultados obtenidos de todas las fases experimentales.

6.1 EXPERIMENTO 1: PRUEBA DE TOXICIDAD CON *Artemia salina*

En la Figura 21, se observa la relación de las frecuencias acumuladas de los crustáceos de *Artemia salina* muertas con respecto a las vivas obteniéndose los log de la concentración para dicromato de potasio (control positivo) igual 1.38 (CL50=24.2 ppm) y para el extracto acuoso de flor de Cempazúchitl igual a 2.49 (CL50= 316.2 ppm).

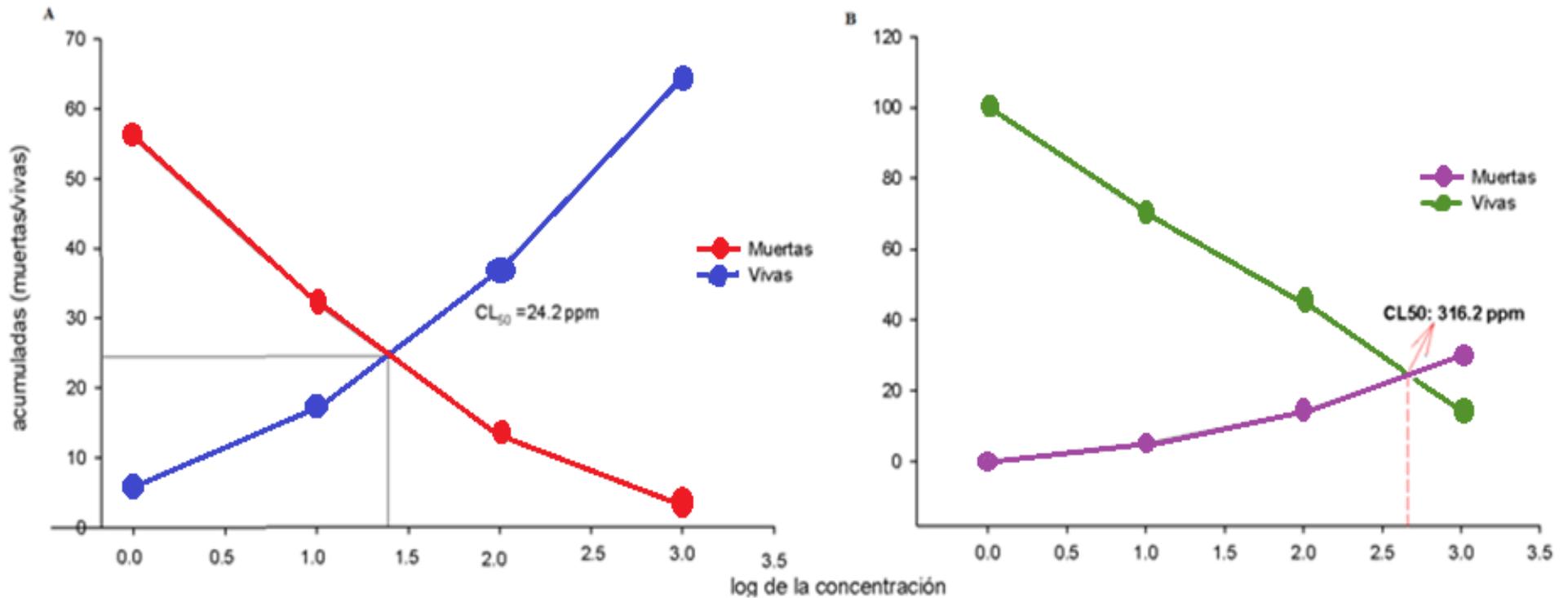


Fig. 21 Frecuencia acumulada de crustáceos de *Artemia salina* vivos vs muertas con respecto al logaritmo de la concentración A) Control positivo (dicromato de potasio), B) Extracto de Flor de Cempazúchitl.

6.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIDIARREICO DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA FLOR DE CEMPAZÚCHITL.

En relación a los resultados obtenidos, después de la administración de carbón activado, se observó el tránsito de este en intestino delgado de los animales según el tratamiento y cuál fue el punto donde apareció el carbón activado (Fig.22)

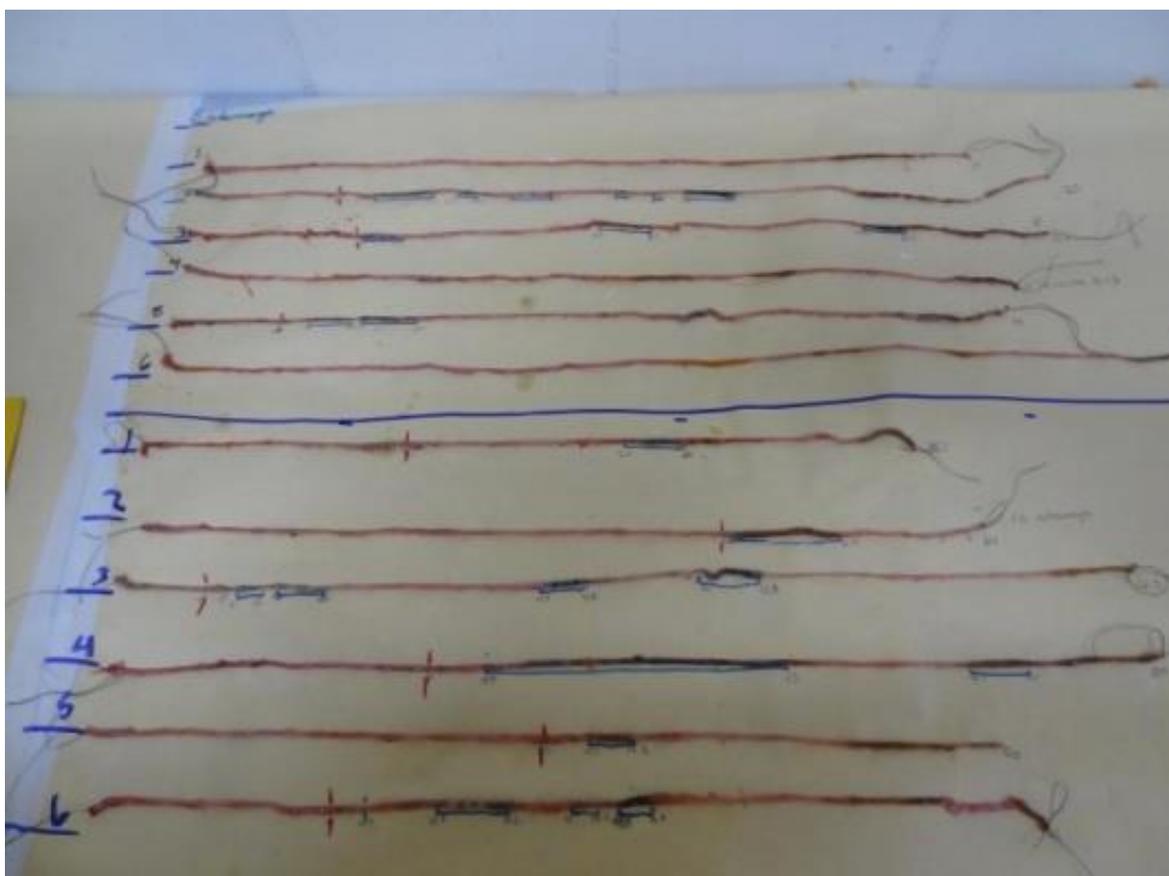


Fig. 22 Tejido intestinal de los ratones de los grupos con tratamiento

Con respecto al tratamiento de cada grupo se obtuvo el % de recorrido del carbón activado (los datos crudos pueden observarse en el Anexo 1), en donde para el extracto acuoso de la flor de Cempazúchitl disminuyó la motilidad intestinal en forma proporcional a la dosis. Teniendo un mejor efecto con la dosis de 25 mg/kg siendo significativamente diferente con respecto a su control a $p < 0.05$, ($F = 5.1$); por

lo que se rechazó la hipótesis nula, este mismo efecto se observó con la administración de Loperamida $p < 0.05$, ($H=22.5$)(Cuadro 1).

Cuadro 1. Resultados de la medición de los intestinos de ratones CD1, donde se representa el porcentaje de avance del carbón en cada uno de ellos.

No.	% de recorrido intestinal							
	Control	Carbón Activado	Loperamida (mg/kg)			Cempazuchitl (mg/kg)		
			0.25	2.5	25	0.25	2.5	25
1	56.8	50.8	56.5	50.4	8.1	32.7	91.8	15.3
2	97.5	72.2	95.4	25.9	20	69	17.1	8.1
3	68	72.7	45.3	21.9	9.5	8.6	19.0	21.8
4	...	85.7	...	20.	10.5	30.9
5	44.1	67.1	...	90.2	6.8	50	13.6	27.0
6	90.1	73.6	10.4	...	7.3	25	...	28.6

La figura 23 nos demuestra que en los grupos con dosis de 0.25 y 2.5mg/kg tanto de Ivermectina como de flor de Cempazúchitl, existió una disminución en el avance del carbón activado en el intestino, como se observa ésta se llevó a cabo de manera paulatina conforme aumentaba la dosis, sin embargo la más significativa se presentó en los grupos con la dosis de 25 mg/kg tanto de Loperamida como del extracto acuoso de la flor de Cempazúchitl.

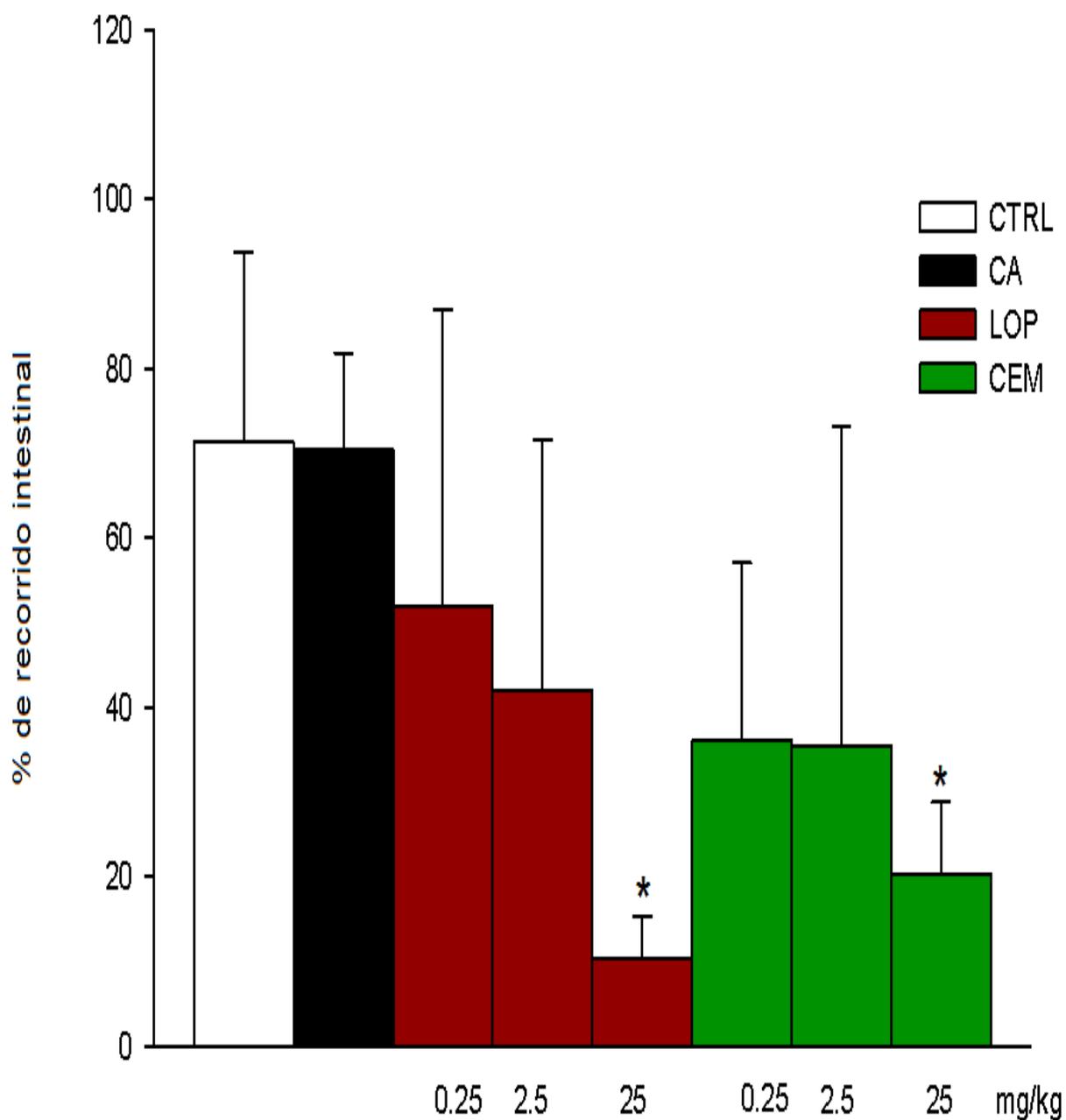


Fig. 23 Porcentaje del recorrido intestinal, donde CTRL corresponde al grupo control, CA al grupo tratado solamente con carbón activado, LOP a los grupos experimentales tratados con Loperamida y CEM a los grupos tratados con el extracto acuoso de la flor de Cempazúchitl. Los (*) representan una $p < 0.05$, con respecto del control.

6.3 EXPERIMENTO 2: EVALUACIÓN DEL EFECTO DESPARASITANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA FLOR DE CEMPAZÚCHITL

Al inicio del experimento se analizó un grupo piloto de 16 individuos con la dosis de 0.4 mg/kg para Ivermectina y el extracto acuoso de la flor de Cempazúchitl respectivamente, no obstante al administrarse de forma crónica, esta dosis se presentaron efectos adversos (como diarrea, pelo hirsuto, problemas respiratorios y muerte) para ambos grupos; por lo cual se optó por la dosis menor referida en la literatura (22).

A continuación se describen los resultados observados para cada prueba con el microscopio fotónico para las dosis 0.4 y 0.08 mg/kg.

Con respecto a la técnica de Faust: Fue negativa para ambas dosis en relación a *Giardia muris*, para los grupos control y tratamientos.

Para la técnica de flotación así como para la de Graham se hallaron huevos con el tamaño y la morfología correspondientes a *Syphacia obvelata*, (Fig.24) e *Hymenolepis nana* (Fig.25) ya que se realizaron mediciones con la escala presente en el ocular y se confirmaron estas medidas consultando la literatura, los huevos midieron en promedio 130 X 40 μ y 40 X 55 μ respectivamente.



Fig. 24 Huevos de *Syphacia obvelata* hallados con la técnica de Graham en las heces de ratón CD1 para las dosis de 0.4 y 0.08 mg/kg



Fig. 25 Huevo de *Hymenolepis nana* hallado con la técnica de flotación en las heces de ratón CD1 para las dosis de 0.4 y 0.08 mg/kg

Después se obtuvo el promedio del número de huevos por tratamiento en las 3 semanas de duración del experimento de una N=40 individuos, para la técnica de flotación solo se obtuvieron resultados para la dosis de 0.04 mg/kg en donde se observa la disminución del número de huevos en función del tiempo, en la tercera semana la erradicación es casi total de huevos, ($F=1e-4$, $p<0.05$) (Cuadro 2), en el caso de la dosis de 0.08 mg/kg solo en el control se encontró la presencia huevos de *Hymenolepis nana* por lo cual no se reporta en la cuadro 2.

Cuadro 2. Promedio de huevos de *Syphacia obvelata* e, hallados con la técnica de flotación en las heces de ratones, a los que se administraron Ivermectina(IVR) y Extracto acuoso de Flor de Cempazúchitl(CEM) con una dosis de 0.4mg/kg

Dosis	0.4mg/kg								
Semana	1			2			3		
Huevos	CTRL	IVR	CEM	CTRL	IVR	CEM	CTRL	IVR	CEM
<i>Syphacia obvelata</i>	4	6	0	5	2	1	5	0.2	0.2
<i>Hymenolepis nana</i>	34	12	9	32	0	0	34	5	5

En la figura 26 podemos observar la disminución en el promedio de huevos presentes de *Syphacia obvelata* en los grupos con tratamiento administrados con la dosis de 0.4 mg/kg (IVR y CEM) comparados con el grupo control en la prueba de flotación, así mismo podemos observar que en los animales pertenecientes al grupo control (CTRL) durante todo el periodo de evaluación se mantiene constante el número de huevos, con respecto a los grupos experimentales no se encontraron diferencias significativas (H=17, p= 0.3).

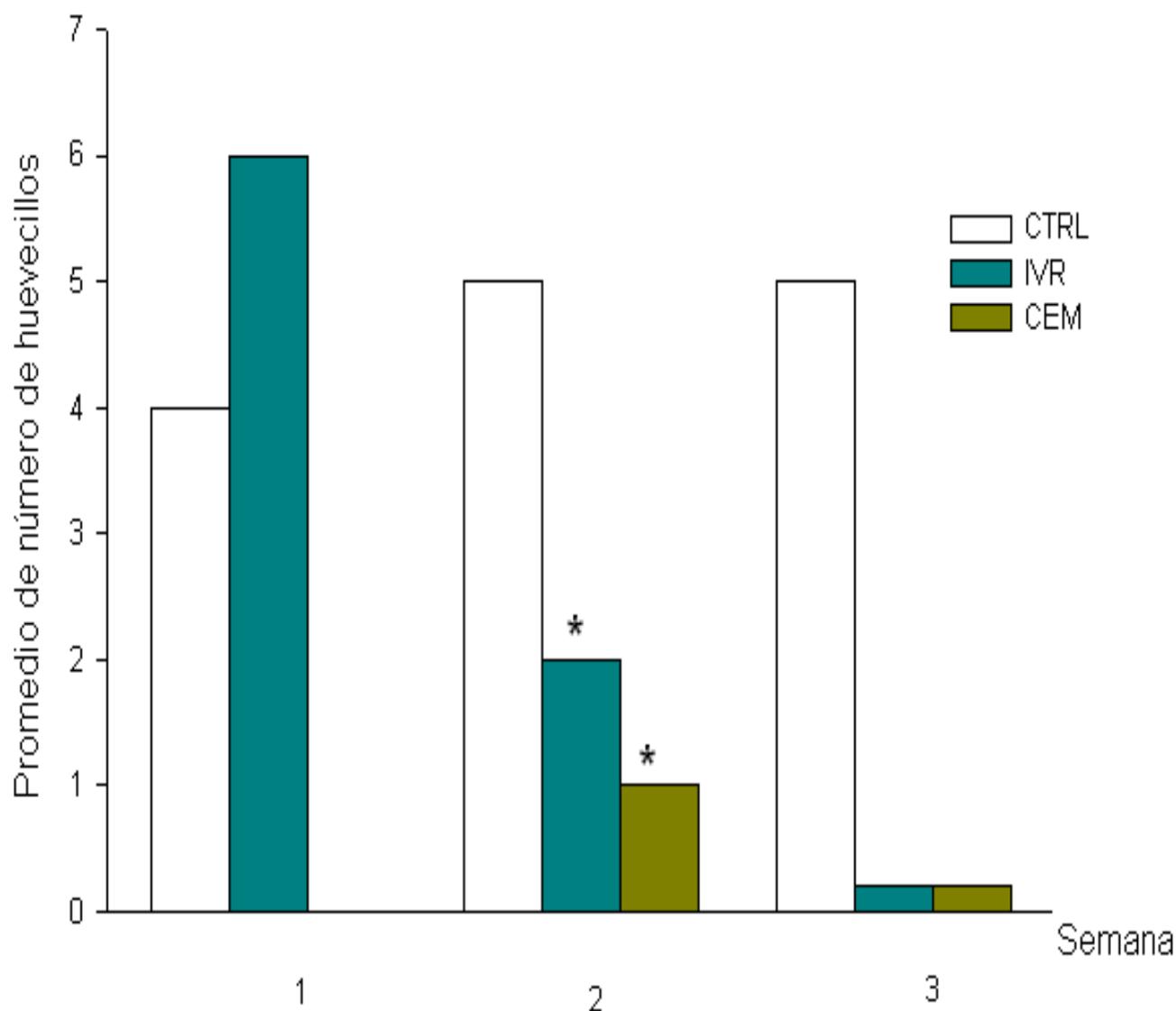


Fig. 26 Promedio del número de huevos de *Syphacia obvelata*, hallados en las 3 semanas de duración del experimento con la técnica de flotación, donde CTRL es el grupo control, IVR es el grupo de Ivermectina y CEM es el grupo del extracto acuoso de la flor de Cempazúchitl, los asteriscos corresponden a las diferencias significativas cuando $p < 0.05$

Se observa en la figura 27 como también existió un número constante de huevos de *Hymenolepis nana* en el grupo control comparado con los grupos experimentales, como se aprecia el máximo efecto tanto de la Ivermectina como del extracto se logró en la segunda semana, es decir, después de la primera administración; en la tercera semana se presentó un ligero aumento en el número de huevos, lo que podría indicar una reinfección. Se encontraron diferencias significativas de los grupos experimentales con respecto del control ($F=1e-4$, $p<0.05$)

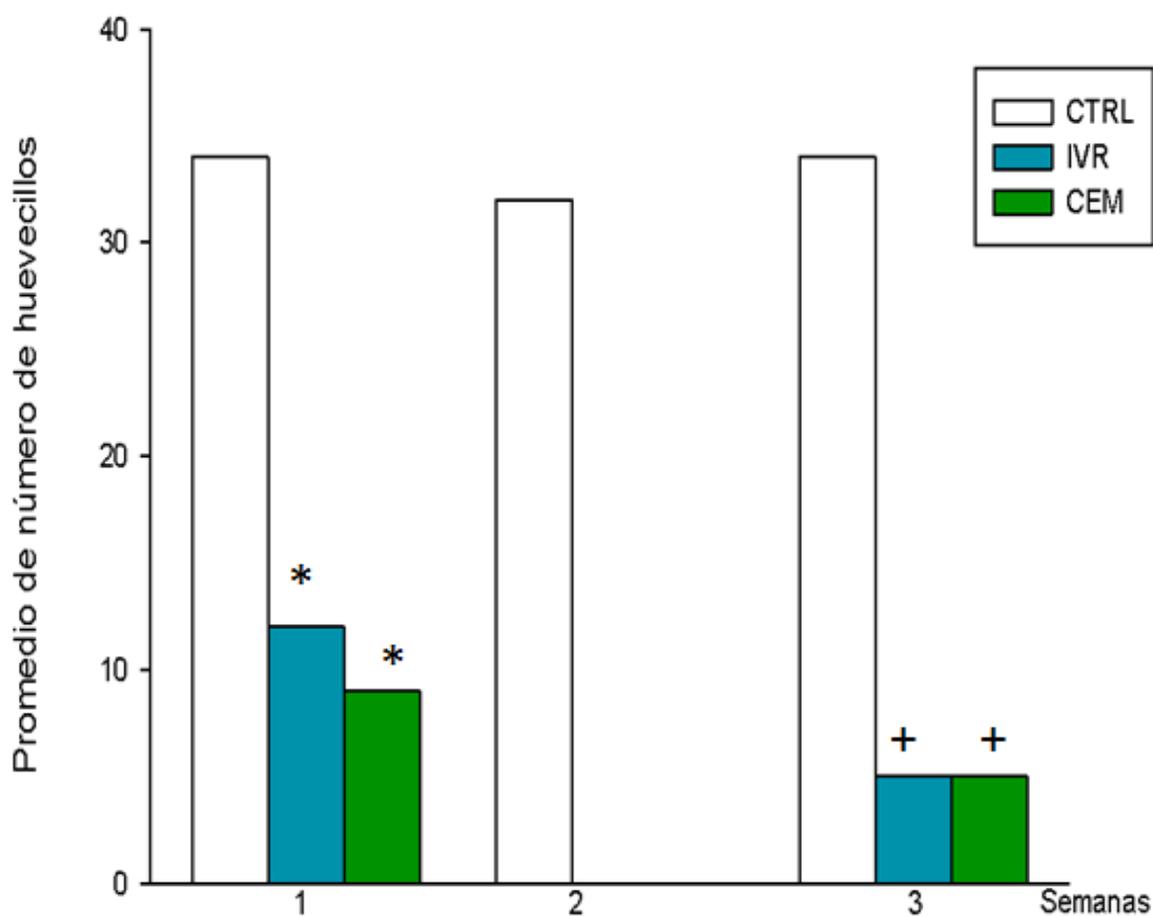


Fig. 27 Promedio de huevos de *Hymenolepis nana*, hallados en las 3 semanas de duración del experimento, con la técnica de flotación, donde CTRL corresponde al grupo control, IVR al grupo de Ivermectina y CEM al grupo del extracto acuoso de la flor de Cempazúchitl los asteriscos representan diferencias significativas a $p<0.05$, de los grupos experimentales con respecto del grupo control y con respecto a sí mismos, las cruces representan diferencias significativas entre los grupos experimentales y el control.

Observamos en la figura 28 como en el grupo de 0.08 mg/kg la reducción de huevos fue del 71% para el extracto de la flor de Cempazúchitl en la segunda semana mostrándonos la máxima eficacia de este extracto, el efecto es parecido a la Ivermectina a la misma dosis, encontrándose diferencias significativas en ambos grupos con respecto del control ($F=1e-4$, $p<0.05$). Con la dosis de 0.4mg/kg observamos diferencias significativas ($F=1e-4$, $p<0.05$), ya que hubo reducción en el número de huevos de los grupos experimentales con respecto del

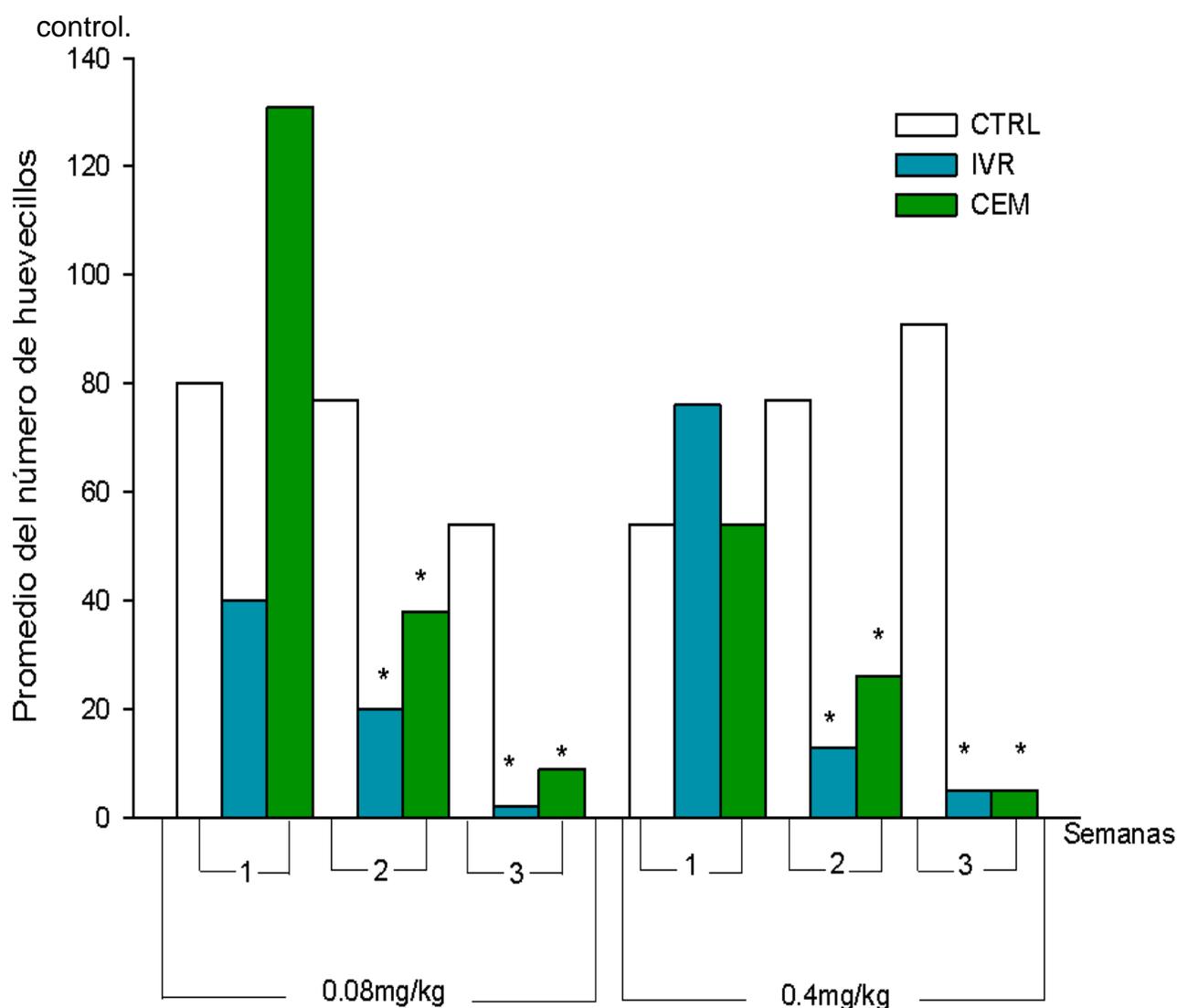


Fig. 28 Promedio del número de huevos de *Syphacia obvelata* hallados en las 3 semanas de duración del experimento con la técnica de Graham, donde CTRL se refiere a nuestro grupo control, IVR al grupo de Ivermectina y CEM al grupo del extracto acuoso de la flor de Cempazuchitl, los asteriscos (*) muestran diferencias significativas con respecto a su control a $p<0.05$.

En el caso de *Hymenolepis nana* (Fig. 29) existió una reducción de los huevos de los grupos tratados con IVR y CEM con respecto del control ($F=1e-4$, $p<0.05$), sin embargo para la dosis de 0.08 mg/kg no se encontró ningún huevo de este parásito en los grupos tratados a excepción del control, por lo que no fueron graficados.

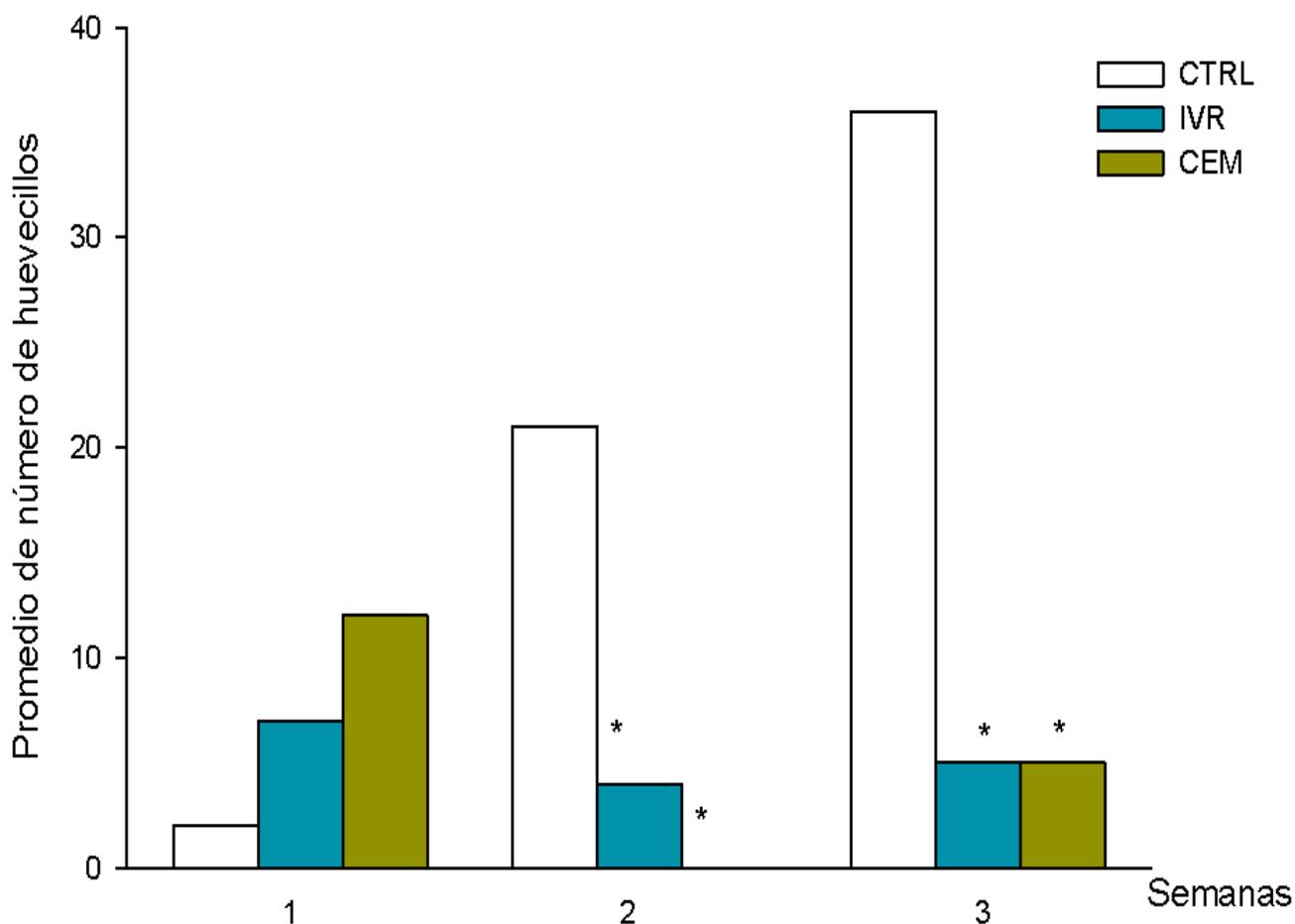


Fig. 29 Promedio del número de huevos de *Hymenolepis nana*, hallados en las 3 semanas de duración del experimento con la técnica de Graham, CTRL corresponde al grupo control, IVR al grupo tratado con Ivermectina y CEM al grupo tratado con el extracto acuoso de la flor de Cempazúchitl. El asterisco marca una diferencia significativa cuando $p<0.05$.

El grupo con la dosis 0.08 mg/kg para Ivermectina y el extracto de *Tagetes erecta*, presentaron la expulsión de vermes adultos al día siguiente de la primera administración, los vermes encontrados son de color blanco con una longitud promedio de 1.5 mm (Figura 30).

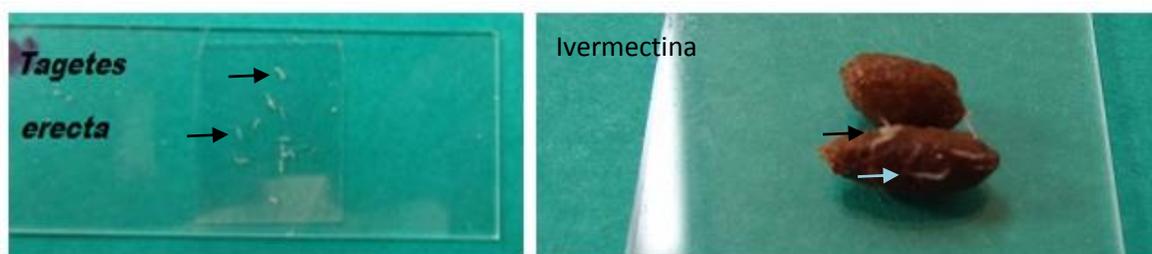


Fig. 30 Vermes adultos en heces frescas de ratones. Las flechas indican la presencia de los parásitos.

Posteriormente los vermes encontrados se observaron con el microscopio fotónico, revelando que se trataba de hembras grávidas casi en su totalidad. Lo cual puede indicar que los parásitos adultos están muriendo antes de que se presente la postura de los huevos y se sequen por si mismos (Fig. 30).

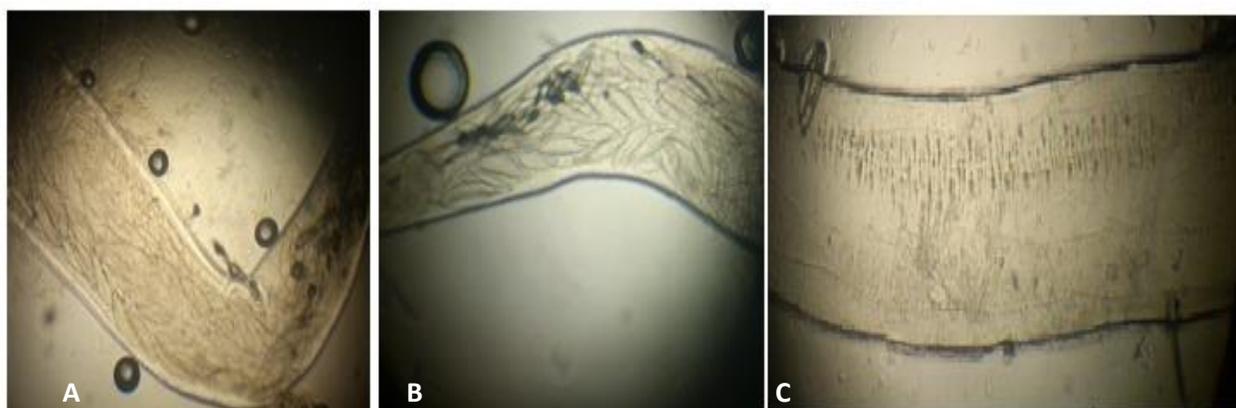
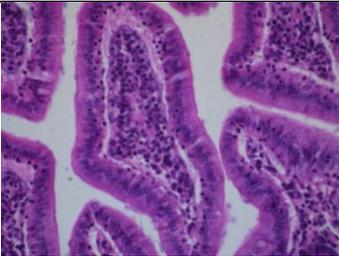
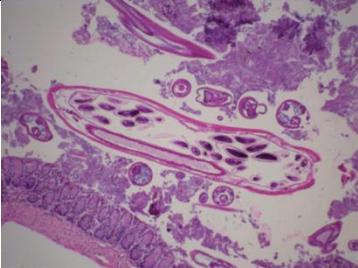
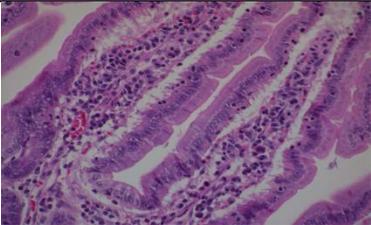
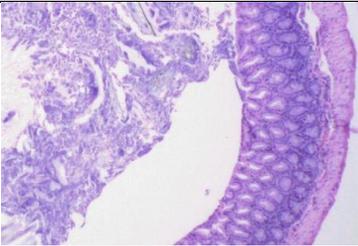


Fig. 31 Vermes de *Syphacia obvelata* observados al microscopio fotónico a 10x. A) Hembras grávidas y B) Hembra vacía

6.4 EXAMEN HISTOPATOLÓGICO.

El examen fue realizado en el Departamento de Patología en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia en la Universidad Nacional Autónoma de México, utilizando la tinción de Hematoxilina-Eosina y mediante observaciones al microscopio fotónico (Cuadro 4).

Cuadro 4. Estudio Histopatológico de los controles y los tratamientos.

Grupo	Imagen	Descripción
Control		Fotomicrografía de intestino delgado de ratón H/E, 10x. Se observa reactividad de las células inflamatorias, principalmente linfocitos y plasmocitos a nivel de la mucosa
Control		Fotomicrografía con presencia de múltiples formas adultas parasitarias en la luz del íleon de ratón H/E, 10x
CEM 0.4mg/kg		Fotomicrografía donde se observa reactividad linfocitaria a nivel de yeyuno H/E, 40x
CEM 0.08mg/kg		Fotomicrografía de intestino delgado de ratón sin cambios aparentes H/E, 40x

7. DISCUSIÓN

En relación con el bioensayo de actividad con *Artemia salina* al obtener una CL50 de 316.2ppm del extracto de la flor de Cempazúchitl se puede determinar que es un compuesto bioactivo, ya que se ha reportado que a concentraciones menores de 500ppm pueden presentar efectos que, son posibles de ser traspolados y evaluados en especies superiores (mamíferos) (29) ya que esta prueba es una herramienta útil y sencilla de actividad y toxicidad para predecir citotoxicidad de compuestos puros o extractos totales(29).

Con respecto a los resultados obtenidos en la evaluación del efecto antidiarreico, se determinó que el extracto acuoso de la flor de Cempazúchitl (*Tagetes erecta*) presenta una efectividad antidiarreica tan eficaz como la de la Loperamida a la misma dosis (25 mg/kg); en el caso de la Loperamida este efecto pudiera deberse a que, a nivel de músculo liso disminuye la liberación de acetilcolina y prostaglandinas, lo que atenúa la peristálsis, así como, inhibiendo la calmodulina, provocando un aumento en la absorción de electrolitos y agua en la luz intestinal. En relación al extracto acuoso de la flor de Cempazúchitl, posiblemente el efecto antidiarreico similar al de la Loperamida pueda deberse a la quercetina, que es un flavonoide presente en los pétalos de la flor de Cempazúchitl al que también se le atribuyen propiedades antiespasmódicas y antiinflamatorias (2, 5, 36 y 37). Asimismo otra posible explicación de este efecto antidiarreico es que también los pétalos contienen pectina, la cual es un heteropolisacárido utilizado comúnmente como un agente espesante y que tiene como efecto gelatinizar los líquidos, sin

afectar ni adherirse a las paredes intestinales, por lo que en el intestino se encarga de aumentar la viscosidad de las heces (21).

Por último en el estudio realizado para determinar del efecto desparasitante de la flor de Cempazúchitl; se encontró que para la dosis de 0.4 mg/kg de IVR y CEM se tuvo que realizar un doble ensayo ya que al administrar esta dosis que esta reportada como dosis efectiva para IVR (11 y 34) se presentó sensibilidad, tolerancia y muerte en un 80% de los animales administrados, es por esta razón que se tuvo que modificar y administrar la dosis más baja recomendada (0.08 mg/kg). Los resultados demuestran que a esta dosis se obtiene un efecto desparasitante de un 70% de efectividad tanto de IVR como de CEM, sin embargo existen diferencias significativas en cuanto al parásito eliminado ya que con respecto a *Hymenolepis nana* después de la administración crónica no se encontró presencia de huevos y para *Syphacia obvelata* disminuye exponencialmente esto puede deberse a que los compuestos presentes en el extracto acuoso del CEM como son el bitienilo y el α - tertienilo (2, 3 y 5) pueden tener un mecanismo muy similar a la Ivermectina; ya que se observó, que los vermes adultos fueron incapaces de realizar la postura de los huevos. Posiblemente la causa de esta ruptura e impedimento de la postura del huevo pueda deberse a que se generan radicales libres de oxígeno que esclerotiza los tejidos blandos de los parásitos como se reporta para Ivermectina (21,22 y 23).

En los cortes histológicos utilizando la técnica de tinción H/E, se evaluó que la administración del extracto CEM no causa alteraciones morfológicas e histológicas en la porción del intestino delgado, lo cual sugiere que puede ser utilizado a las

dosis evaluadas tanto para el proceso antidiarreico como para su uso como desparasitante. Se aprecia el mismo patrón en el grupo de Ivermectina; sin embargo en el grupo control se tuvo reactividad de células inflamatorias a nivel de la mucosa, ya que como este grupo son animales intactos al no recibir ningún tratamiento (IVR y CEM) la parasitosis generó que el organismo activara el sistema inmunológico y se desencadenara el proceso de inflamación (9, 10 y 11)

8.CONCLUSIONES.

- El extracto acuoso de la flor de Cempazúchitl es una sustancia con una actividad biológica alta
- Posee un efecto antidiarreico muy similar a la Loperamida.
- Este mismo extracto acuoso de flor de Cempazúchitl (*Tagetes erecta*) presenta un efecto desparasitante parecido a la Ivermectina.
- Los estudios histopatológicos revelaron que no causa irritación o pérdida de la continuidad del tejido epitelial en el intestino de ratones.

9. ANEXO 1

EXPERIMENTO 2: EVALUACION DEL EFECTO ANTIDIARREICO DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA FLOR DE CEMPAZUCHITL.

Longitud total del intestino de los ratones y punto exacto donde fue hallado el carbón activado, al grupo control se le suministró metilcelulosa y dado que se encontraban en ayuno de 12 horas fue posible rastrear el punto exacto donde ésta se detuvo. Los puntos suspensivos indican que la medición del intestino no pudo realizarse debido a la ruptura del mismo en el cadáver del ratón o a que el carbón fue hallado en sitios que no pertenecían al intestino, como el estómago o el ciego.

Ctrl	Long intestino (cm)	Punto exacto MC (cm)	CA	Long intestino (cm)	Punto exacto CA (cm)
1	48	27.3	1	43.5	22.1
2	60	58.5	2	44.3	32
3	50	34	3	47.4	34.5
4	4	42	36
5	53	23.4	5	51.5	34.6
6	60	54.1	6	52	38.3
LOP0.25 mg/kg	Long intestino (cm)	Punto exacto CA (cm)	LOP2.5 mg/kg	Long intestino (cm)	Punto exacto CA (cm)
1	49	27.7	1	51.5	26
2	46	43.9	2	52	13.5
3	47.8	21.7	3	52.5	11.5
4	55.5	...	4	51.6	10.8
5	5	49	44.2
6	52.5	5.5	6	54	...
LOP25 mg/kg	Long intestino (cm)	Punto exacto CA (cm)	CEM0.25 mg/kg	Long intestino (cm)	Punto exacto CA (cm)
1	55	4.5	1	43	14.1
2	52	10.4	2	44.2	30.5
3	52.5	5	3	52.3	4.5
4	57	6	4	51.4	15.9
5	58	4	5	43	21.5
6	54.2	4	6	44	11
CEM2.5 mg/kg	Long intestino (cm)	Punto exacto CA (cm)	CEM25 mg/kg	Long intestino (cm)	Punto exacto CA (cm)
1	49	45	1	52	8
2	55.5	9.5	2	52.9	4.3
3	53.5	10.2	3	48.5	10.6
4	51	...	4	52	...
5	49	6.7	5	48	13
6	59.5	...	6	49.5	14.2

Nota: El material vegetal para llevar a cabo este experimento se obtuvo del mercado de Sonora, puesto 219 el cual se recolectaba del estado de México e Hidalgo.

10. BIBLIOGRAFIA

- 1.- CASTILLO R. T, QUIJANO L, REYES C.R. Algunas reflexiones actuales sobre la herbolaria prehispánica desde el punto de vista químico, Rev. Latinoamer.Quim. 40(2): 41-64: 2012
- 2.- ROJAS ALBA M; Tratado de medicina tradicional mexicana. Bases históricas, teoría y práctica clínico terapéutica; Plaza y Valdez editores S.A de C.V; México D.F. 2009.
- 3.-ARGUETA V.A et al; Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana I, Instituto Nacional Indigenista, México D.F 1994.
- 4.-VIBRANS H., Malezas de México, *Tagetes erecta* [ficha online] Agosto 2009 [citado enero 2013] disponible desde: URL:<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/tageteserecta/fichas/ficha.htm>
- 5.-OSUNA TORRES L, Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales, estudio entobotánico, fotoquímico y farmacológico. I Editions, Barcelona 2005
- 6.- GOPI G, ELUMALAI A, JAYASRI P; A concise review on *Tagetes erecta*, Internal journal of phytopharmacy research. 3:183-8: 2012.
- 7.-FOX J.G, Laboratory Animal Medicine, Academic Press, Elsevier Science; San Diego California 2002
- 8.-HEDRICH H.J, BULLOK G; The laboratory mouse, Elsevier Academic Press, London United Kingdom 2004.
- 9.-THE JACKSON LABORATORY, Biology of Laboratory Mouse [libro online], Diciembre 2007 [citado Julio 2013] disponible desde URL: <http://www.informatics.jax.org/greenbook/frames/frame13.shtml>
- 10.- JUBB KVF, KENNEDY P.C; Patología de los animales domésticos, tomo II, Academic Press, Orlando Florida 1990.
- 11.- VELAZCO M.A et al, Farmacología fundamental, McGraw Hill Interamericana, Madrid España 2003.
- 12.-KATZUNG B.G, Farmacología básica y clínica, El manual moderno, México D.F 1994
- 13.- HARDMAN J.G, Las bases farmacológicas de la terapéutica, McGraw Hill Interamericana, México 2003
- 14.- BAKER D.G; Flynn's parasites of laboratory animals; American College of laboratory animals medicine, Blackwell; Louisiana USA 2007

- 15.-NATIONAL RESEARCH COUNCIL, Infectious diseases of mice and rats, National academy of sciences, USA 2000
- 16.-BAKER D.G; Natural Pathogens of laboratory animals. Their effect on Research; ASIM Press, Washington D.C 2003
- 17.-URQUHART et al; Veterinary Parasitology, Blackwell publishing, Oxford United Kingdom 1996.
- 18.- OWEN D.G; Parasites of laboratory animals; Royal Society of medicine Services Limited, United Kingdom 1992.
- 19.-NATIONAL RESEARCH COUNCIL, Companion Guide to infectious diseases of mice and rats; National Academic Press, Washington D.C 2003
- 20.-HARKNESS J.E, WAGNER J.E, The biology and medicine of Rabbits and Rodents, Williams &Wilkins, USA 1995.
- 21.- SUMANO L.H, OCAMPO C.L; Farmacología Veterinaria, Mc Graw Hill Interamericana, México 2006.
- 22.- FUENTES H.V, Farmacología y terapéutica Veterinarias, Mc Graw Hill, México D.F 1992.
23. - HSU W.H, Handbook of Veterinary Pharmacology, Wiley-Blackwell, Iowa USA 2008.
- 24.-TAYLOR M.A, et al; Veterinary Parasitology, Blackwell, Oxford UK 2011.
- 25.- ANZALDUA A.R, Tolsa S.J, Manual de prácticas de histología veterinaria, FMVZ, UNAM, México D.F 2002.
- 26.- PROPHET E.B, MILLS B, ARRINGTON J.B, Métodos Histotécnicos, Instituto de las fuerzas armadas de los Estados Unidos de América (AFIP), Washington D.C. 1995.
- 27.- CORMACK H.D, Histología de Ham, Harla S.A. de C.V., México D.F 1988.
- 28.- GENESER F., Histología sobre bases biomoleculares, Panamericana, Buenos Aires Argentina 2005.
- 29.- BUSTAMANTE GARCIA R. Cernimiento Neurofarmacológico de dos análogos de la melatonina en ratones CD1 (Tesis de doctorado), IPN 2012.
- 30.- NORMA NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio
- 31.- NARANJO RODRIGUEZ E.B., y col. Manual de Sesiones Prácticas en Farmacología aplicada pp71-74, UNAM Facultad de Química, México D.F. 2009

- 32.-WILLIAMSON M.E.et al, Pharmacological Methods in Phytoterapy Research: Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material pp28-29, John Wilwy& sons, New York USA 1996
- 33.-GERHARD VOGEL A. et al. editor, Drug discovery and evaluations: Safety and Pharmacokinetic Assays, Springer, New York USA 2006.
- 34.- Carpenter J.W, Exotic Animal Formulary, Elsevier Saunders, Philadelphia USA 2005
- 35.- BESNÉ MÉRIDA et. al. , Manual de Prácticas de laboratorio de Parasitología, FMVZ UNAM, México D.F. 2009.
- 36.- ROHINI R.M, AMIT K.D, Antidiarrheal and anti inflammatoryactivities of Lupeol, Quercetin, β - Sitosterol, Adene-5-en-3-ol and Caffaicacid isolated from Rhizophora Mucronata Bark, Der Pharmacia Lettre, 2(5): 95-101:2010
- 37.- ARCE R.E, CHAVEZ S.M, GATTUSO M, LOZOYA L.X, La hoja del guayabo en el tratamiento de afecciones gastrointestinales. Revista de Fitoterapia 2003, 3(2):101-111:2003