

**UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**



**Estandarización de un bioensayo de actividad antiparasitaria utilizando
como organismo modelo a *Fasciola hepática***

Trabajo de titulación previo a la obtención del Título de
Bioquímico Farmacéutico.

AUTORES:

TORRES GARCÍA RUTH CECILIA
VIVAR SEGARRA ERIKA TATIANA

DIRECTORA:

PhD. MARÍA ELENA CAZAR RAMIREZ

ASESORA:

DRA. SONIA AMAYA GOERCCKE TORRES

**CUENCA- ECUADOR
2016**



RESUMEN

El presente trabajo planteó como objetivo estandarizar un bioensayo para evaluar el potencial antiparasitario de sustratos de origen natural y comparar con la acción de un fármaco de referencia.

El trabajo experimental orientado al desarrollo de un bioensayo antihelmíntico usó a *Fasciola hepática* como organismo modelo. La forma adulta del parásito fue obtenida de hígados infestados, obtenidos de bovinos faenados en el Camal Municipal de Cuenca EMURPLAG. La observación macroscópica post-mortem de la fasciolosis, y la identificación de lesiones anatomopatológicas causadas por el parásito fueron indicadores que permitieron aislar tremátodos en estado adulto de los conductos biliares mediante un corte longitudinal en el hígado.

Se monitoreó el mantenimiento y viabilidad de los tremátodos durante 24 horas. Los parásitos sobrevivientes fueron sometidos a diversas concentraciones de extractos vegetales con la finalidad de conocer la eficacia fasciolicida de la misma.

Como resultado de este trabajo experimental se presenta una metodología para el desarrollo de ensayos antiparasitarios “in vitro” en las condiciones de trabajo estándar de un laboratorio de investigación. Esta técnica permitirá evaluar el potencial de sustancias de origen natural como antihelmínticos e identificar sustratos vegetales promisorios como antiparasitarios, constituyendo la base para estudios posteriores enfocados en el desarrollo de nuevos antiparasitarios.

Palabras clave: *Fasciola hepática*, tremátodos, extractos naturales.



ABSTRACT

This paper aims to standardize a bioassay to assess potential antiparasitic naturally occurring substrates, compared its biocide effect with the action of a drug of reference.

The experimental work aimed used *Fasciola hepatica* as a model organism. Adult forms of the parasite were gathered from infected livers from bovine animals slaughtered in the Town hall Slaughterhouse, EMURPLAG. Trematodes were isolated by means of post-mortem observation of fasciolosis, and identification of pathological lesions caused by the parasite. Adult flukes were collected from longitudinal slits performed in infested livers.

Before performing the bioassay, we monitored the viability of trematodes for 24 hours. The antiparasitic activity of plants extracts was tested in a serial dilution assay. Three solutions of plants extracts at different concentrations were seeded to the maintenance media to test the parasites survival under these conditions. After a 24-hour period, we evaluated the trematodes survival, and the effectivity of the extracts was expressed as effectiveness percentage, related to the number of dead flukes.

The results of this experimental work produced a methodology to assess antiparasitic activity "in vitro" at standard working conditions of a research laboratory. This technique will evaluate the potential of naturally occurring substances as anthelmintics and identify promising plant substrates as antiparasitic, forming the basis for further studies focused on developing new antiparasitic bioproducts.

Keywords: *Fasciola hepatica*, flukes, natural extracts.



Índice General

RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
DEDICATORIA.....	11
AGRADECIMIENTOS.....	13
INTRODUCCIÓN.....	14
JUSTIFICACIÓN.....	16
HIPÓTESIS.....	16
OBJETIVOS GENERAL Y ESPECIFICOS.....	17
OBJETIVO GENERAL.....	17
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	17
CAPÍTULO 1.....	18
MARCO TEÓRICO.....	18
GENERALIDADES.....	18
1.2 HELMINTOS QUE PRODUCEN PARASITOSIS HUMANAS.....	18
1.2.1 Clase Nemátoda.....	18
1.2.2 Clase Céstoda.....	19
1.2.3 Clase Tremátoda.....	20
1.3 FASCIOLA HEPÁTICA.....	21
1.3.2 Definición.....	21
1.3.4.1 Forma Adulta.....	22
1.3.4.2 Huevos.....	23
1.3.4.3 Miracidios.....	23
1.3.4.4 Esporoquistes y redias.....	23
1.3.4.5 Cercaria.....	24
1.3.4.6 Metacercaria.....	24
Ilustración 1. Morfología de <i>Fasciola hepática</i>	25
1.3.5 Epidemiología.....	25
1.3.6 Ciclo Biológico.....	26
Huésped intermediario:.....	28
1.3.7 Espectro Clínico.....	28
1.3.8 Diagnóstico.....	30
Métodos Directos.....	30



Métodos Indirectos	30
1.3.9 Prevención y Control	31
1.3.10 Tratamiento.....	32
Tabla 1. Tratamiento para Fasciolosis (Alvarado, 2016).	32
1.4 PRODUCTOS NATURALES CON ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA	33
1.4.1 GENERALIDADES	33
1.4.2 <i>Xenophyllum humile</i>	35
1.4.2.1 Clasificación taxonómica	35
Ilustración 3. <i>Xenophyllum humile</i> . (syn. <i>Werbenia humile</i>) (Van den Brink, 2010).	35
1.4.2.2 Descripción Botánica.....	36
CAPÍTULO 2.....	37
METODOLOGÍA	37
2.1 Modalidad de la Investigación.....	37
2.2 Tipo de Investigación	37
2.3 Muestra.....	37
2.4 Variables	37
2.5 ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIHELMINTICA.....	38
Materiales:.....	38
- Formulación del medio de mantenimiento para tremátodos*	41
Tabla 2. Formulación del Medio de Nutritivo	41
- Extracción de Tremátodos.....	41
- Pruebas de viabilidad de tremátodos en el medio de mantenimiento	41
- Preparación de soluciones de extractos y controles	42
2.5.3 Desarrollo del bioensayo de actividad antiparasitaria.....	42
INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA	43
CAPÍTULO 3.....	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
3.1 RESULTADOS	44
3.1.1 VIABILIDAD DE TREMÁTODOS EN EL MEDIO DE MANTENIMIENTO FORMULADO PARA EL BIOENSAYO	44
Fotografía 1. Formas adultas de <i>Fasciola hepática</i> en tubo falcon.	44
Fotografía 2. Formas adultas de <i>Fasciola hepática</i> en caja Petri	45
3.1.2 ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE EXTRACTOS DE <i>XENOPHYLLUM HUMILE</i>	45



Tabla 3. Actividad antiparasitaria de extractos orgánicos de <i>Xenophyllum humile</i> . NA: No disponible. (-): No probado	46
3.2 DISCUSIÓN	47
3.2.1 FORMULACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DE MATENIMIENTO DE TREMÁTODOS	47
CONCLUSIONES	49
RECOMENDACIONES	50
GLOSARIO	51
ABREVIATURAS:	55
BIBLIOGRAFÍA	56
ANEXO 1. CÁLCULOS	61
PREPARACIÓN DE CONTROL POSITIVO	62
ANEXO 2. LECTURA DE RESULTADOS	63
Tabla 4. Resultados de la Motilidad de los Tremátodos. NA: No disponible. (+): Parásitos muertos. (-): Parásitos vivos	63
Tabla 5. Resultados de la Motilidad de los Tremátodos Duplicado. NA: No disponible. (+): Parásitos muertos. (-): Parásitos vivos	63
ANEXO 3. GALERÍA FOTOGRÁFICA	65
Fotografía 4. Hígado infestado con Formas Adultas de <i>Fasciola hepática</i>	65
Fotografía 5. Cortes del Hígado parasitado.....	65
Fotografía 6. Observación microscópica de huevos de <i>Fasciola hepática</i>	66
Fotografía 7. Forma Adulta de <i>Fasciola hepática</i>	66
Fotografía 8. Medio de Mantenimiento Global for Fertilization	67
Fotografía 9. Extractos en diferentes concentraciones.....	67
Fotografía 10. Extractos redisueltos en el medio de mantenimiento.....	68
Fotografía 11. Formulación del medio de mantenimiento Global en el medio Nutritivo.....	68



Ruth Cecilia Torres García, autor/a de la tesis "Estandarización de un bioensayo de actividad antiparasitaria utilizando como organismo modelo a *Fasciola hepática*", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímico Farmacéutico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor/a

Cuenca, 13 de septiembre de 2016



Ruth Cecilia Torres García

C.I: 0106414519



Erika Tatiana Vivar Segarra, autor/a de la tesis "Estandarización de un bioensayo de actividad antiparasitaria utilizando como organismo modelo a *Fasciola hepática*", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímico Farmacéutico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor/a

Cuenca, 13 de septiembre de 2016



Erika Tatiana Vivar Segarra

C.I: 0104731476



Ruth Cecilia Torres García, autor/a de la tesis "Estandarización de un bioensayo de actividad antiparasitaria utilizando como organismo modelo a *Fasciola hepática*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 13 de septiembre de 2016



Ruth Cecilia Torres García

C.I: 0106414519



Erika Tatiana Vivar Segarra, autor/a de la tesis "Estandarización de un bioensayo de actividad antiparasitaria utilizando como organismo modelo a *Fasciola hepática*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 13 de septiembre de 2016

Erika Tatiana Vivar Segarra

C.I: 0104731476



DEDICATORIA

Dedico esta tesis y toda mi carrera universitaria a la Virgen del Cisne por ser quien ha estado a mi lado en todo momento dándome las fuerzas necesarias para continuar día a día luchando y seguir adelante venciendo todas las barreras que se me presenten.

Mis agradecimientos más profundos a mis papis Vicente y Rosa, ya que gracias a ellos soy quien soy hoy en día, fueron los que me dieron ese amor incondicional, velaron por mi salud, quienes se esforzaron cada día para que no me falte nada y seguir con mis estudios. Agradezco a mis hermanos quienes fueron mi ejemplo a seguir a pesar de las dificultades. Para mis sobrinos Josué, Nicolás y Alejandra. A mis amigas, compañera de tesis y profesores que me brindaron su aliento y cariño.

Cecilia



DEDICATORIA

Dedico este trabajo primeramente a Dios por permitirme el haber llegado a este momento tan importante de mi carrera, por las caídas y triunfos. A Cecilia y María Luisa por ser mi pilar y mi fortaleza y por estar siempre con su cariño incondicional. A Mario por sus consejos y apoyo en todo momento. A Silvia por ser mi ejemplo a seguir. A Vivi, Daya y Mateo sin ustedes nada de esto hubiera sido posible. A mi Paúl, gracias por la paciencia y los ánimos. A mis amigos por haber luchado juntos por este momento.

Tatiana



AGRADECIMIENTOS

A Dios por guiarnos y bendecirnos cada día y mostrarnos que con perseverancia todo sacrificio tendrá su recompensa sobre todo en nuestro sueño y grande anhelo de alcanzar una etapa más en nuestras vidas al ser profesionales. A nuestros padres excepcionales que nos han guiado y acompañado desde el inicio de nuestras vidas, que con enseñanza, sabiduría, apoyo y amor se han mostrado como un digno ejemplo a seguirles, enseñándonos a alcanzar nuestras metas.

De igual manera a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de este proyecto de grado: A nuestra directora de tesis, la Doctora María Elena Cazar, por su incansable dedicación, valioso apoyo, esfuerzo, ánimo, orientación y continua generosidad y ayuda para la realización de esta tesis. A la Doctora Sonia Goercke por su valioso e imprescindible asesoramiento para el procesamiento de las muestras escogidas. Al Camal Municipal ERMUPLAG por abrirnos sus puertas y permitir el acceso a las muestras para la elaboración del bioensayo. A nuestros queridos maestros que nos han impartido sus sabios consejos y enseñanzas durante nuestra formación académica y nos han impulsado a seguir adelante persiguiendo nuestros sueños y a todas las personas que de una u otra manera apoyaron a culminar este trabajo.

Cecilia T.

Tatiana V.



INTRODUCCIÓN

“La parasitosis intestinal se refiere a infestaciones producidas por parásitos cuyo hábitat natural es el aparato digestivo de las personas; esto se considera un problema de salud pública en países subdesarrollados ya que muchos de estos, sufren deterioro socioeconómico que se refleja en el estado de salud de la población, principalmente en los niños. Los parásitos están ampliamente diseminados alrededor del mundo, describiéndose elevadas tasas de prevalencia, donde se reúnen las características geográficas y climatológicas que contribuyen a las necesidades biológicas de helmintos, permitiendo su diseminación” **(Vinueza, 2014)**.

Ecuador tiene una elevada incidencia de parasitosis, la cual afecta al 80% de la población rural y al 20% en el área urbana. La pobreza y las deficientes condiciones sanitarias derivadas de ella, por su mayor riesgo de infección por helmintos, repercuten en el estado nutricional del individuo. Los parásitos intestinales, a través de diferentes mecanismos relacionados con el tipo de patógeno, privan al organismo de nutrientes **(Pérez & col, 2013)**.

Los seres humanos han dependido de la naturaleza para sus necesidades básicas: producción de alimentos, vivienda, vestimenta, medios de transporte, fertilizantes, sabores, fragancias y medicinas. Las plantas han formado la base de sistemas de medicina tradicional de civilizaciones milenarias. Los primeros reportes del uso de plantas datan del año 2600 A.C, en Mesopotamia. Las civilizaciones egipcias y chinas documentaron el uso de cerca de 700 plantas. Los antiguos griegos contribuyeron al uso racional de drogas vegetales, para combatir enfermedades, algunas debidas a infestaciones por parásitos.

La fascioliasis es considerada como una de las enfermedades desatendidas causadas por parásitos pertenecientes al filo Platyhelminthes. Las infestaciones por parásitos del género *Fasciola* son responsables de condiciones crónicas de importancia biomédica, veterinaria y suelen afectar colectivamente una considerable proporción de las poblaciones humanas y animales. La fascioliasis



es una enfermedad parasitaria causada por *Fasciola hepatica* (Tremátoda: Digenea) reconocida como un problema de salud, que está íntimamente ligado con el consumo de agua y vegetales contaminados con el digeneo. La Organización Mundial de la salud (OMS) ha estimado que 2,4 millones de personas están infectadas con este parásito y cerca de 180 millones están en riesgo de infestación. En la actualidad, el número de personas infectadas puede ser mayor si se tiene en cuenta el desconocimiento sobre la enfermedad en muchos países. *Fasciola hepática* tiene un gran potencial de expansión gracias a la capacidad de colonización de los agentes transmisores y de adaptación a los hábitats y climas diferentes, incluso a condiciones extremas como en las regiones de alta montaña de los Andes.

La elevada incidencia y relevancia clínica de esta parasitosis requiere el desarrollo de nuevos antihelmínticos a partir de productos naturales. La medicina convencional no ha generado nuevos productos antiparasitarios en los últimos años, y la mayoría de los microorganismos han desarrollado fármaco-resistencia. El uso indiscriminado e incorrecto de medicamentos ha dado como resultado efectos colaterales a los pacientes, los cuales no tienen acceso a ciertos medicamentos por su elevado costo o disponibilidad. Entre los antiparasitarios de referencia se puede citar al albendazol; derivado de los benzimidazoles, utilizado para el tratamiento de esta parasitosis. Este compuesto produce efectos secundarios, de acuerdo con la dosis utilizada o la susceptibilidad personal. Por ello es importante buscar fármacos que sean más efectivos y estimulen los mecanismos de defensa innata de los hospederos; por lo tanto los productos naturales representan una opción para buscar y desarrollar nuevos fármacos que sean selectivos, efectivos y de menor costo.



JUSTIFICACIÓN

El presente estudio se enfocó en las parasitosis causadas por helmintos que constituyen un importante problema de salud pública por su alta tasa de prevalencia y distribución mundial, afectando con más frecuencia a los países subdesarrollados de bajo nivel socio-económico. La pobreza y las deficientes condiciones sanitarias derivadas de ella dan lugar a una inadecuada alimentación, provocando un déficit de macro y micronutrientes que se ven reflejados en el estado nutricional e inmunológico de quienes lo padecen.

Los productos naturales que fueron incluidos en esta investigación, representó una probabilidad de desarrollar una nueva generación de fármacos antihelmínticos, ya que el ser humano se ampara cada vez más en el uso de plantas con propiedades medicinales, complementando o solucionando sus problemas de salud, pues el acceso a los medicamentos convencionales resulta difícil por su elevado costo sin mencionar las reacciones adversas e interacciones que estos tienen con otros fármacos **(Satalaya & col, 2012)**.

Las personas inmunodeprimidas constituyen un grupo vulnerable frente a los parásitos helmintos, razón por la cual se ha planteado un estudio *in vitro* en el cual se probará la efectividad antiparasitarios de extractos naturales frente a *Fasciola hepática*, mismos que serán comparados con fármacos de referencia. Los resultados del presente estudio servirán como fundamento para el desarrollo de posteriores investigaciones orientadas al desarrollo de antiparasitarios de origen natural.

HIPÓTESIS

Es factible desarrollar un ensayo *“in vitro”* para la evaluación de la actividad antiparasitaria de productos naturales usando como organismo modelo *Fasciola hepática*.



OBJETIVOS GENERAL Y ESPECIFICOS

OBJETIVO GENERAL

Poner a punto una técnica de evaluación de actividad antiparasitaria aplicable a extractos vegetales, utilizando como organismo modelo a *Fasciola hepática*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Estandarizar un bioensayo de actividad antihelmíntica en las condiciones experimentales del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas.
- Evaluar la actividad antihelmíntica de un grupo de extractos vegetales y compararlos con fármacos de referencia.



CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1 PARASITISMO

GENERALIDADES

Se designa como parásito a aquel organismo que, con el fin de alimentarse, reproducirse o completar su ciclo vital, se aloja en otro ser vivo, de forma permanente o temporal, produciendo en él ciertas reacciones. El parásito que se localiza en el hospedador no aporta ninguna compensación, sino que vive a partir de su sustancia corporal, lo cual ocasiona perjuicio alguno. Sin embargo, se puede recalcar de una acción patógena de un parásito cuando éste es capaz de producir alteraciones. Estas pueden pasar desapercibidas, por ejemplo, cuando el curso es insidioso pueden tener significación económica a causa del descenso de la producción, también ocasionan síntomas evidentes a la muerte, entre los parásitos de interés incluyen un grupo heterogéneo de organismos animales que pertenecen a las clases: Tremátodos, Céstodos, Nemátodos (**Torres, 2010**).

1.2 HELMINTOS QUE PRODUCEN PARASITOSIS HUMANAS

Los helmintos comunes de humanos pertenecen a tres grupos:

- 1 Nemátodos (áscaris)
- 2 Céstodos (tenias)
- 3 Tremátodos (distomas)

1.2.1 Clase Nemátoda

Son gusanos cilíndricos con simetría bilateral, sus dimensiones van desde milímetros hasta casi medio metro. Uno de los extremos puede estar acuminados no existiendo separación entre las distintas partes corporales. Algunas especies parasitarias tienen configuración de botella, piriformal o de salchicha, superficie corporal raramente lisa y en la mayor parte de los casos



finalmente apilada. Los adultos tienen los órganos sexuales maduros, de modo que, en este estado, las hembras pueden ser fecundadas y dar origen a huevos o larvas. **(Sampedro, 2013).**

Ciclo Directo: Incluyen gusanos como *Enterobius vermicularis* y el *Trichiuris trichuria*. Se denomina así, porque cuando el humano ingiere los huevos larvados, éstos se transforman en gusanos adultos, al llegar al intestino grueso **(Rodríguez, 2013).**

Ciclo Directo Modificado: Pueda ser transmitida por picadura de artrópodos hematófagos que inoculan la fase infestante de los parásitos. Una vez dentro del hospedero realizan una migración hacia el sitio de infestación donde alcanzan su madurez sexual. El desarrollo de los nemátodos se puede ver afectado por la temperatura y la humedad, así como otros factores biológicos como insectos, ácaros, hongos, e incluso algunos virus pueden afectar su desarrollo. Los huevecillos larvados entran por vía oral y llegan al intestino delgado. Debido a que los gusanos son aún más pequeños, tienen que madurar al migrar por el hígado, corazón, pulmón; de tal manera que la forma larvaria actúa como un alérgeno y provoca una neumonitis. Se menciona en este grupo *Áscaris lumbricoides* **(Sampedro, 2013).**

1.2.2 Clase Céstoda

Constituyen un grupo de gusanos planos del phylum Platyhelminthes. Los céstodos de mayor importancia médica y económica se encuentran incluidos en la familia *Taeniidae*. Son animales invertebrados macroscópicos, aplanados, en forma de listón, de diversos tamaños. Con pocas excepciones, los céstodos adultos habitan en el intestino delgado de los hospederos vertebrados. Las especies de interés médico se agrupan en 2 órdenes:

- *Pseudophyllidea*
- *Cyclophyllidea* **(Uribarren, 2013).**

El cuerpo de estos parásitos, está constituido por un **scolex (cabeza)** donde se encuentran los órganos de fijación, representados siempre en ventosas y en ganchos cuando la *Taenia* es armada, **zona germinatriz (cuello)** es una



formación no segmentada, se localiza en el borde del scolex y escondido por la zona de crecimiento, en razón que en esta porción se forman los anillos o segmentos del cestodo y **estróbilo (conjunto de anillo)**, está conformado por una cadena de anillos que se inicia en el cuello. Los anillos próximos al cuello son más jóvenes y los más distantes. Denominaciones de “anillos indiferenciados”, “hermafroditas o en transición” y “maduros grávidos u ovigeros”, suelen darse a los segmentos o anillos dependiendo al grado de desarrollo o maduración.

La longitud de los céstodos oscila entre varios milímetros a metros. El número de proglotides o segmentos pueden comprender desde tres a cuatro hasta 4.500 (**Roverano, 2013**).

Cada proglotido tiene sus propios órganos de reproducción tanto masculino como femenino, a medida que van madurando el órgano masculino se va degenerando, hasta que en los últimos proglotidos de la cadena solo se observan huevecillos fecundados una vez maduros los proglotidos se desprenden de la cadena madre saliendo del hospedero, sin embargo algunas especies desprenden sus huevecillos dentro del mismo intestino; otras, una vez liberadas fuera del hospedero tienen la facultad de moverse en el medio y buscar ingresar a su hospedero; mientras que otras especies, como la *Taenia solium* (solitaria) necesita de un huésped intermediario para madurar y habitar a su huésped definitivo (**García, 2010**).

1.2.3 Clase Tremátoda

Esta clase incluye a un grupo heterogéneo de gusanos planos (platelmintos), que agrupa a los helmintos más abundantes en el reino Animalia, después de los nemátodos. Son parásitos que, en su fase juvenil o de adulto, afectan a toda clase de vertebrados e invertebrados.

Su tamaño puede ser desde pequeño a mediano, la mayoría mide de 2 a 30 mm, aunque algunos adultos miden menos de 1 mm y otros pueden superar los 10 cm. Son generalmente planos. Casi todos poseen un sistema digestivo incompleto y son monoicos, salvo algunas excepciones (Schistosomatidae) (**Godoy, 2011**).



Un número limitado de tremátodos digenéticos tiene importancia médica, pero varias especies causan severas pérdidas económicas debido a las parasitosis que producen en ganado y animales domésticos.

Los tremátodos de importancia médica se ubican en la subclase Digenea, entre ellos los géneros:

- *Fasciola*, *Clonorchis* y *Epistorchis* (hígado)
- *Fasciolopsis*, *Heterophyes*, *Metagonimus* y *Echinostoma* (intestino delgado)
- *Paragonimus* (pulmones)
- *Schistosoma* (hemático) **(Uribarren, 2013)**.

1.3 FASCIOLA HEPÁTICA

1.3.1 Características Generales

Fasciola hepática es el tremátodo hepático del ganado bovino, ovino y de otros rumiantes, se encuentran en los conductos biliares del hígado y presentan un aspecto típico. Es un parásito aplanado en forma de hoja, de apariencia carnosa y color café claro, con extremo anterior saliente en forma de cono. Mide aproximadamente de 2 a 3 cm de largo por 1 cm de ancho y en la parte anterior presenta dos ventosas. Son hermafroditas y los órganos genitales masculino y femenino (vitelaria), están muy desarrollados, ramificados y poseen un orificio o poro genital cercano a la ventosa ventral. El aparato digestivo consiste en faringe, esófago y el ciego dividido en dos tubos ramificados. Los huevos son ovalados y con un opérculo o tapa en uno de sus extremos, miden aproximadamente 150 micras en su longitud mayor **(Botero y Restrepo, 2012)**.

1.3.2 Definición

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria producida por la presencia del tremátodo denominado *Fasciola hepática* localizado en el parénquima y conductos biliares de animales productivos y el hombre; ocasionando trastornos digestivos y de la nutrición **(Sampedro, 2013)**.



1.3.3 Clasificación Taxonómica de *Fasciola hepática*

Dominio: Eukarya
Reino: Metazoa
Phyllum: Plathyhelminthes
Clase: Trematoda
Orden: Prosostomata
Superfamilia: Echinostomatoidea
Familia: Fasciolidae
Género: *Fasciola*
Especie: Hepática

Existen dos especies la *Fasciola gigantica* es más grande y de áreas tropicales, mientras que la *Fasciola hepática* es más pequeña y de áreas con condiciones climáticas templadas; existiendo únicamente en América la *Fasciola hepática* **(Moscoso, 2014)**.

1.3.4 Morfología

1.3.4.1 Forma Adulta

La *Fasciola hepática* adulta es aplanada, de forma lanceolada, como hoja carnosa, color café parduzco; mide alrededor de 3 por 1.5 cm. En el extremo anterior lleva una estructura cónica en donde se halla la boca, próxima a las ventosas oral y ventral. El parásito tiene un tegumento blando, recubierto por espinas dirigidas hacia atrás. Las fases larvarias se multiplican abundantemente (poliembrionía); por ello, el potencial biótico reproductivo es enorme. Considerándose que a partir de un solo huevo fértil se producirán miles de formas infectantes **(Carrada, 2010)**.

El aparato digestivo es incompleto, formado por una cavidad bucal pequeña que se continúa por una faringe, esófago que se bifurca formando dos ramas laterales, las cuales se dirigen hacia la porción posterior del cuerpo del gusano, para terminar en ciegos intestinales. Es hermafrodita. El útero es corto. Los



diversos componentes del huevo se juntan en el segmento proximal del útero; las células vitelinas son abundantes, en forma de racimos de uvas y distribuidas por todas las porciones laterales; de ellas se desprenden gránulos vitelógenos que contienen proliferol y proteínas. El ootipo se distingue hacia el final del primer tercio de su cuerpo y a su derecha visto por la cara ventral, se sitúa un ovario arborescente, en tanto que los testículos, muy ramificados ocupan toda la zona central de los dos tercios posteriores; sus dos conductos eferentes se reúnen para desembocar en una bolsa del cirro muy desarrollada **(Moscoso, 2014)**.

1.3.4.2 Huevos

Los huevos son operculados, de color amarillo, levemente amarronados, ovalados y no están embrionados en la materia fecal. Es indispensable que el huevo entre en contacto con el agua para que comience el desarrollo del embrión, miden de 130 a 150 micras de longitud por 60 a 90 micras de ancho; tienen opérculo, son de color amarillento, la cubierta formada por esclerotina (proliferol y proteínas). La maduración se efectúa en el agua a los 9 a 15 días a temperatura de 22 a 25°C **(Prepelitchi, 2011)**.

1.3.4.3 Miracidios

Es una larva ciliada que eclosiona tras la maduración de los huevos. Por acción enzimática desprenden el opérculo del huevo y salen a nadar libremente con movimientos activos que se favorecen por la luz del sol; así encuentran al hospedador intermediario, un caracol pulmonado de agua dulce del género *Fossaria* o *Pseudosuccinea*, o de la familia *Lymnaeidae*, a los que deben encontrar en unas 8 horas e invadirlos por el pie, perforando las células epiteliales y subepiteliales del caracol **(Prepelitchi, 2011)**.

1.3.4.4 Esporoquistes y redias

Las larvas miracidio se transforman en esporoquistes o esporocistos dentro del caracol. Los esporocistos originan la primera generación de redias (sucede en



unas 3 semanas). Pasando una semana más se forma la segunda generación de redias y posteriormente aparecen las cercarías **(Chalco, 2012)**.

1.3.4.5 Cercaria

Las cercarias son larvas libres que nadan activamente en el agua, donde maduran después de abandonar el caracol en grandes cantidades (1 miracidio produce unas 500 a 650 cercarias). Nadan con su cola, durante 8 a 12 horas; luego pierden la cola, se hacen redondas y se enquistan formando la metacercaria **(Chalco, 2012)**.

1.3.4.6 Metacercaria

La metacercaria es la forma infectante para el hombre y para los demás animales que sirven de hospedador definitivo. Generalmente se encuentran enquistadas en la vegetación acuática semi sumergida que normalmente comen los animales, pero el hombre también acostumbra a ingerirlas. También se adquiere la infección tomando aguas contaminadas. Al llegar al duodeno se desenquistan liberando un parásito juvenil que perfora la pared intestinal y en unas 3 horas, se aloja en la cavidad peritoneal en donde pasa de 3 a 16 días; posteriormente avanza por el peritoneo, llega a la cápsula de Glisson, la perfora, penetra al parénquima hepático del cual se alimentan los parásitos juveniles durante su migración hacia los conductos biliares en donde se desarrolla hasta el estado adulto, lo que sucede en unos 2 meses; después empezará a reproducir huevos que salen al exterior con la bilis y materias fecales, complementando así el ciclo biológico **(Roverano ,2013)**.



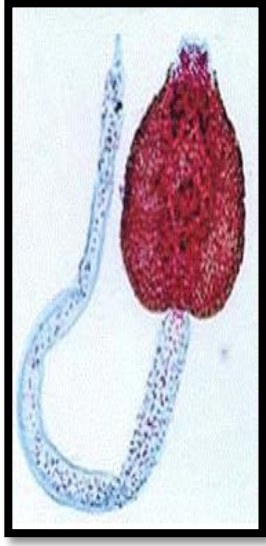
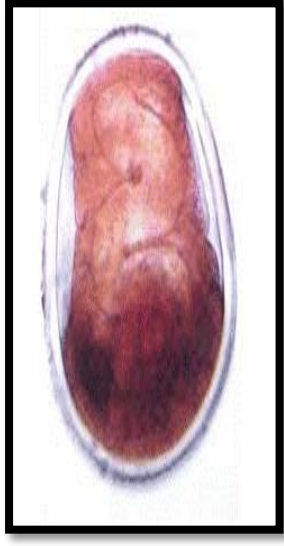
			
<i>Fasciola hepática</i> adulta (Gonzales, 2013)	Huevo de <i>Fasciola hepática</i> (Arteaga,2013)	Cercaria (Arteaga,2013)	Metacercaria (Gonzales & col, 2013)

Ilustración 1. Morfología de *Fasciola hepática*

1.3.5 Epidemiología

Esta parasitosis se presenta con mayor frecuencia en lugares en los que las características ecológicas son idóneas para el desarrollo de caracoles como son los márgenes de los ríos, charcas temporales, canales de riego, pequeñas lagunas y, en general, terrenos húmedos. En zonas endémicas afecta principalmente a los niños, disminuyendo la intensidad de la infección a medida que aumenta la edad. Se debe tener en cuenta la importancia de detectar la parasitosis, sobre todo en el ganado, ya que los animales son una fuente importante de propagación de la infección. Según el estadio de desarrollo y el número de parásitos presentes en el hombre podemos diferenciar dos fases en la sintomatología producida por *Fasciola hepática* (Pereira, 2014).



Varios factores intervienen para la enfermedad: biológicos, topográficos, climáticos y humanos (manejo).

- a. Factores biológicos favorecen la enfermedad: la alta postura de huevos, la resistencia de las metacercarias en el ambiente, permanencia muy larga en el huésped, alto poder reproductivo de los caracoles, Es desfavorable para la aparición de la enfermedad: la resistencia en bovinos, corta vida del miracidio, presencia de depredadores, resistencia relativa de los caracoles **(Carpio, 2012)**.
- b. Factores climáticos que favorecen: Temperaturas mayores de 10°C y humedad adecuadas para el desarrollo del miracidio y de los estadios larvales en el caracol. Son desfavorables las bajas temperaturas luego de condiciones buenas para el caracol pueden retrasar la evolución de estadios juveniles que se reactivarán en la primavera siguiente. Por lo tanto, en invierno se disminuye la contaminación de los pastos **(Prepelitchi, 2011)**.
- c. Factores topográficos que favorecen: Áreas húmedas permanentes con fuentes de agua renovables y son desfavorables, las áreas secas, aguas rápidas y aguas estancadas, períodos secos prolongados **(Carpio, 2012)**.
- d. Factores humanos que favorecen están: La alta carga de animales susceptibles sobre áreas contaminadas, falta de drenajes, falta de alambrados, mal uso de productos fasciolicidas. Son desfavorables el aislamiento de los animales más débiles de las áreas infestadas, el buen uso estratégico de drogas fasciolicidas, manejo con animales menos susceptibles **(Carpio, 2012)**.

1.3.6 Ciclo Biológico

El ciclo de vida de *Fasciola hepática* es complejo, pero debe ser entendido para poder llevar a cabo estrategias de control adecuadas. Este parásito es un tremátodo (gusano chato) que tiene dos huéspedes obligatorios: uno definitivo y otro intermediario. Los huéspedes definitivos más importantes son los



bovinos y ovinos, pero los cerdos, equinos, cabras, conejos y el hombre también puede ser infectados **(Déborah, 2014)**.

Los parásitos adultos se localizan en los conductos biliares de los animales y del hombre. Los huevos salen al intestino con la bilis y son eliminados en las materias fecales. Para embrionar es indispensable que caigan al agua dulce, en la cual dan origen a la primera forma larvaria que sale a través del opérculo. Este es el miracidio ciliado que nada libremente en el agua e invade un caracol (huésped intermediario) del género *Lymnaea* en el cual se reproduce y forma esporoquistes, redias y cercarías, estas últimas tienen un cuerpo redondeado y cola no bifurcada, abandonan el caracol, nadan en el agua para buscar plantas a las que se adhieren y se transforman en metacercarias de aproximadamente 0,5 cm, redondeadas y cubiertas de una membrana gruesa. Esta metacercarias se encuentra dentro del tejido vegetal, de modo que no son eliminadas con el lavado de las plantas parasitadas **(Déborah, 2014)**.

Los huéspedes definitivos se infectan al ingerir estas plantas contaminadas. En el intestino delgado se libera el parásito inmaduro, que atraviesa la pared intestinal, el peritoneo y la cápsula hepática, para luego buscar los canales biliares en donde se desarrolla en adulto 3 a 4 meses **(Botero y Restrepo, 2012)**.

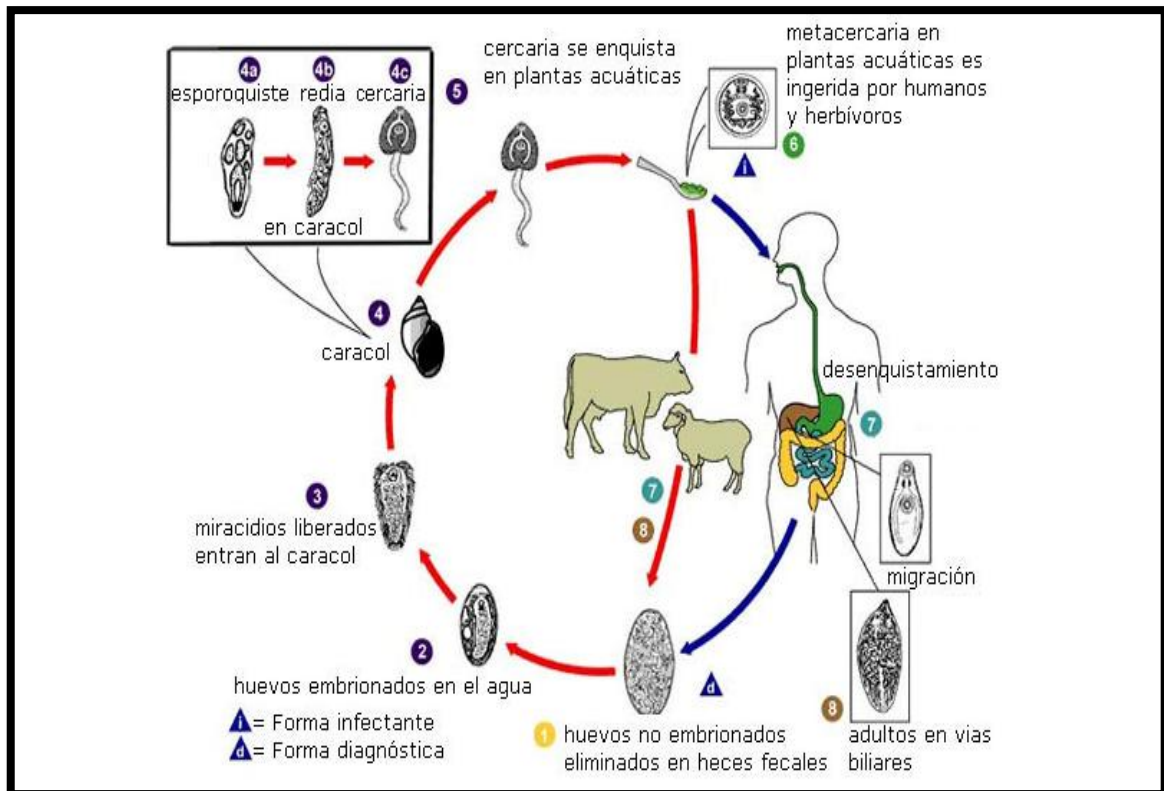


Ilustración 2. Ciclo de vida de *Fasciola hepática* (Martínez, 2012).

Huésped intermediario: El huésped intermediario de *Fasciola hepática* es un caracol anfibio del género *Lymnaea*, se encuentran en lugares húmedos como canales de riego, zanjas, aguas poco profundas y no estancadas, ofrecen condiciones suficientes para el desarrollo de los caracoles y permiten así la infección de los pastos llegando a ser muy prolíficos, un sólo caracol en un año puede producir hasta 100'000 de caracoles (Moscoso, 2014).

1.3.7 Espectro Clínico

Ésta parasitosis se puede presentar de forma aguda, latente o crónica. Las manifestaciones clínicas que ocasiona esta entidad generalmente son inespecíficas y varían de acuerdo con la fase de la enfermedad. La forma aguda está asociada con la tríada de fiebre, hepatomegalia y eosinofilia. La forma latente se puede comportar de forma asintomática; en ocasiones pueden aparecer escasas manifestaciones gastrointestinales, y la fase crónica sintomática se caracteriza por cólico biliar, ictericia, colangitis, pancreatitis y fibrosis hepática (Martínez, 2012).



- **Infección Humana Aguda:** La infección aguda se inicia con la ingesta de la forma infectiva del parásito (metacercaria) y su desenquistamiento en la porción superior del intestino delgado e inicio de migración hacia el hígado; esta fase es llamada invasiva o aguda y dura entre tres a cinco meses. Los síntomas son fiebre, hepatomegalia con dolor abdominal e hipereosinofilia. Mediante tomografía computarizada se puede visualizar lesiones hepáticas compatibles con la migración de los parásitos juveniles por el hígado, imágenes similares a metástasis y con tractos en el parénquima hepático tipo serpiginoso.

La fase aguda puede causar complicaciones graves a la salud del paciente y gastos significativos si se presenta hematoma subcapsular o abscesos, los cuales pueden terminar en cirugía o en prolongada hospitalización, e inclusive puede causar la muerte (**Espinoza & col, 2010**).

- **Infección Humana Crónica:** Una vez en los conductos biliares, el parásito adulto causa hiperplasia de las paredes con marcada fibrosis y extensivo daño en la arquitectura hepática causada por la secreción de enzimas parasitarias que destruyen el parénquima hepático. Los síntomas reflejan la obstrucción biliar causada por los parásitos adultos, si esta es parcial o si el parásito ingresa a la vesícula biliar, los síntomas son dolor crónico en el hipocondrio derecho o en abdomen superior semejante al cuadro de colecistitis crónica reagudizada causada por cálculos biliares; y si la obstrucción es completa, se presenta ictericia y requiere de cirugía o colangiopancreatografía retrógrada endoscópica de emergencia. La eosinofilia se presenta en aproximadamente el 50% de los casos.

La fase crónica se considera como una amenaza silenciosa para el paciente, ya que el parásito puede sobrevivir más de una década y causar daño de manera asintomática o con síntomas inespecíficos, en ese contexto, la disfunción del hígado por el daño hepático podría ser irreversible (**Pereira, 2014**).

El epitelio puede presentar hiperplasia pseudoglandular. Cuando el número de parásitos es muy grande, se presenta atrofia en el parénquima hepático por compresión y cirrosis periportal (**Pereira, 2014**).



1.3.8 Diagnóstico

El diagnóstico en humanos está basado en el hallazgo de los huevos del parásito en heces o en el fluido duodenal, pero este presenta serias dificultades, dado fundamentalmente por la eliminación de los huevos de forma intermitente por el parásito. Esto ha originado que los sistemas inmunoenzimáticos de determinación de antígenos de excreción-secreción (AgES) del parásito constituyan una alternativa necesaria e indispensable para lograr este objetivo **(Torrel, 2013)**.

Los exámenes de laboratorio se realizan por métodos directos, cuando se encuentra el parásito adulto o sus huevos, o indirectos, al detectar anticuerpos u otros signos de sensibilización del hospedero **(Torrel, 2013)**.

Métodos Directos

El diagnóstico parasitológico se efectúa por el hallazgo de huevos en la bilis y en las materias fecales. Estos son negativos en el período de invasión de *Fasciola hepática*, ya que el parásito aún no ha llegado a la madurez sexual. El examen de heces debe ser de forma seriada, mediante la realización de diferentes métodos como la coloración con eosina o lugol, concentración de Ritchie o Faust y el Kato-Katz. El parásito adulto puede observarse macroscópicamente durante el acto quirúrgico de las vías biliares **(Martínez, 2012)**.

Métodos Indirectos

Ensayo Inmunoenzimático ES78- sándwich ELISA (FasciDig) Es una alternativa diagnóstica. Esta técnica se basa en la detección de coproantígenos. Usando anticuerpo monoclonal ES78 de la subclase IgG segunda. Tiene la facultad de detectar la infección activa, en cualquiera de sus fases con una sensibilidad del 95% y una especificidad del 99%. ES78-sándwich Elisa, es un ensayo inmunoenzimático de doble anticuerpo en el cual este anticuerpo monoclonal AcM78 de la subclase IgG2 segundo solo reconoce los antígenos ES de *Fasciola hepática*, es usado para la captura específica de los antígenos presentes en el suero y las heces de los pacientes y animales



infectados. La unión antígena – anticuerpo es entonces revelada mediante la adición de un anticuerpo IgG obteniendo en obtenido en conejos contra antígenos ES del parásito, conjugado con la enzima peroxidasa, seguido del sustrato correspondiente **(Martínez, 2012)**.

Para realizar el diagnóstico clínico es importante tener presente la eosinofilia elevada como signo fundamental para la sospecha de fasciolosis humana. En ocasiones también puede observarse leucocitosis con anemia de magnitud variable. El porcentaje de eosinófilos varía entre 11 y 60 %, el ascenso es progresivo, sobre todo durante el período de invasión, y se mantiene en el período de estado. Se pueden realizar otros complementarios, como la radiografía, ultrasonografía abdominal y la colangiopancreatografía retrógrada endoscópica **(Torrel, 2013)**.

1.3.9 Prevención y Control

La fasciolosis es una enfermedad de mayor importancia veterinaria que humana, principalmente en ganado vacuno y ovino, aunque también afecta caballos, cerdos, conejos, etc.

Debido al mecanismo de infección al ingerir berros, como verduras para consumo humano y tomar aguas aromáticas hechas con hierbas acuáticas, pueden existir brotes familiares. Las medidas de prevención consisten en evitar el consumo de plantas acuáticas que se utilizan crudas para la alimentación y en el control de los caracoles que actúan como huéspedes intermediarios, mediante moluscocidas **(Chávez, 2012)**.

Es necesario tomar medidas en el entorno tales como:

- Drenaje y cercado de las zonas húmedas, que es donde va a vivir el caracol que actúa como hospedador. La utilización de molusquicidas y otros productos químicos para eliminar los caracoles no es viable por su alto costo y por el impacto ambiental que pueden provocar **(Espinoza & col, 2010)**.
- El control debe integrar las acciones quimioterápicas con la preservación de la entrada de los animales a los lugares poblados por moluscos intermediarios,

especialmente en las épocas que determinen los patrones locales de transmisión, lo que se puede conseguir con el establecimiento de simples barreras mecánicas o rotación de pastos.

- La metacercarias pueden persistir en los pastos hasta 2-3 meses después de que el agua de una inundación se haya secado y los animales susceptibles se deben mantener alejados durante el período de riesgo. Los caracoles repueblan con rapidez los pastos en cuanto se mojan y se debe retirar al ganado antes de que el hospedador **(Espinoza & col, 2010)**.

1.3.10 Tratamiento

El triclabendazol es la droga de elección en la actualidad. La dosis es de 10 a 20 mg/kg de peso que puede administrarse como dosis única, pero es recomendable dos dosis, con el intervalo de un día y administrando la dosis después del desayuno. **(Chalco, 2012)**.

Enfermedad	Medicamento y posología recomendados	Estrategia recomendada
	Tratamientos de Casos Individuales	
Fasciolosis	Triclabendazol: 10 mg/kg en una sola toma (en caso de fracaso se puede administrar una dosis doble: 20 mg/kg)	–Tratar todos los casos confirmados – En zonas endémicas: tratar todos los casos presuntos
	Quimioterapia Preventiva	
Fasciolosis	Triclabendazol: 10 mg/kg en una sola toma	En las subdivisiones de los distritos, aldeas o comunidades donde haya conglomerados de casos de fasciolosis: tratar a todos los niños en edad escolar.

Tabla 1. Tratamiento para Fasciolosis **(Alvarado, 2016)**.



1.4 PRODUCTOS NATURALES CON ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA

1.4.1 GENERALIDADES

Las plantas y sus extractos se han utilizado durante siglos para el tratamiento de muchas dolencias, desde dolores de cabeza hasta enfermedades, sin embargo, la investigación farmacológica de productos naturales representa la mejor estrategia para el descubrimiento y desarrollo de nuevas drogas. El uso de plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades parasitarias es bien conocido y documentado desde tiempos antiguos **(Saenz, 2014)**.

El control de la Fasciolosis se ha basado en la aplicación de antihelmínticos, pero debido al desarrollo de la resistencia parece ser que la eficacia de algunos productos químicos ha disminuido **(Álvarez & col, 2015)**.

El uso de plantas con actividad antihelmíntica puede ser una alternativa al control de los gusanos. La búsqueda de compuestos bioactivos con propiedades antihelmínticas aumenta significativamente debido a que, metabolitos secundarios son los compuestos más importantes como nuevas alternativas para el control de parásitos. Algunos metabolitos como los alcaloides, saponinas, taninos, flavonoides, terpenos (mono, di y sesquiterpenos) han demostrado ser activos contra una amplia gama de parásitos **(Álvarez & col, 2015)**.

Cada vez es más evidente que una fuente relativamente sin explotar de entidades químicas para el desarrollo de nuevos antihelmínticos son las plantas y sus productos naturales. Las plantas poseen un variado arsenal de reservas químicas que se han desarrollado para ayudar en la protección de las mismas y por ello se ha explotado para usos medicinales desde hace siglos.

Una alternativa a las drogas sintéticas, es también, la búsqueda de extractos



de plantas contra parásitos o metabolitos secundarios derivados de ellas. Los productos naturales siguen desempeñando un papel importante en la terapia. Un buen punto de partida para encontrar productos naturales antiparasitarios sería a partir de plantas medicinales tradicionales, que se han empleado para tratar un sinnúmero de infecciones.

Los páramos de los Andes de Sudamérica albergan la flora tropical montana con mayor riqueza en el mundo. En este ecosistema existe una alta diversificación causada, posiblemente, por cambios climáticos, que generan distintos microclimas, donde las especies pueden adaptarse **(Saenz, 2014)**.

Los páramos junto con los bosques andinos funcionan como control de los sistemas hídricos, al absorber agua de lluvia y liberarla lentamente alimentando a ríos y lagunas. Los páramos tienen una diversidad biológica y endemismo altos y constituye una biota única.

Las especies se han adaptado a las condiciones frías y extremos de alta irradiación solar, la baja presión atmosférica, las dramáticas fluctuaciones diarias de temperatura y lluvias estacionales. Así, muchas plantas crecen pegadas al suelo en forma de rosetas o almohadillas o tienen las hojas reducidas y duras, o están recubiertas de una densa capa de pelos blancos o plateados **(Ulloa, 2010)**.

En el área del páramo se conocen cuatro tipos de vegetación:

1. El “súper páramo” o “arenal”, se encuentra en las cimas de los montes más altos como Cerro Arquitecto o Cerro Amarillo, algunas especies se han adaptado a crecer directamente en la arena o en grietas entre las rocas.
2. El “páramo de pajonal”, domina el área como un inmenso mar de paja con manchones de arbustos y hierbas coloridas.
3. El “páramo de almohadillas”, se encuentra entre los sitios más húmedos. Está formado por plantas tan apretadas entre si que forman especies de

almohadones. Pueden estar formadas por un solo individuo o por varios individuos de la misma o distintas especies.

4. La vegetación arbustiva y arbórea, se conforma de especies de arbustos con hojas gruesas y duras (**Ulloa, 2010**).

1.4.2 *Xenophyllum humile*

1.4.2.1 Clasificación taxonómica

Nombre común: Cojín de agua

Nombre científico: *Xenophyllum humile*

Familia: Asteraceae (**Jaramillo, 2014**).



Ilustración 3. *Xenophyllum humile*. (syn. *Werbenia humile*) (**Van den Brink, 2010**).



1.4.2.2 Descripción Botánica

Plantas en almohadillas muy compactas que miden hasta 1m de diámetro. Las hojas están dispuestas en espiral, miden hasta 1,5cm de largo, son muy estrechas y gruesas. Las inflorescencias son cabezuelas que crecen a nivel del suelo, de hasta 1 cm de diámetro.

Las flores son de dos tipos: las externas (± 12) son irregulares y presentan una lengüeta blanca, las internas (± 25) son cortas, tubulares y con cinco dientes, de color amarillo. Los frutos poseen una corona de pelos sedosos, blancos (**Ulloa, 2010**).

Por lo general se encuentra en grandes montículos densamente empaquetados, algunos de un metro o más de diámetro. Aunque por lo general crece en el suelo o en las zonas de rocas pequeñas en un páramo muy húmedo de la Provincia de Morona Santiago; se encontró colgando de un acantilado y en la cumbre en el Parque Nacional Cajas (Prov. Azuay, 4400).

Es común en todos los Andes del Ecuador en 3200 hasta 4700 metros de elevación. La especie es conocida desde el centro de Colombia hasta el norte de Perú.

En Ecuador es la especie más común del género, constituido por hojas verdes medianas y raíces laterales, las plantas más grandes tienen hojas que miden 2,5 cm de largo, mientras que los más pequeños tienen hojas de 1,2 cm de largo (**Valencia y Balslev, 2011**).

Xenophyllum es un género reciente que ha sido segregado del género Werneria y se diferencia porque forma cojines compactos y tiene hojas a lo largo de los rizomas. En las flores se producen los gametos y en ellas tienen lugar la fecundación y la formación de frutos y semillas (**Jaramillo, 2014**).



CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

2.1 Modalidad de la Investigación

Se desarrolló una investigación de corte experimental, orientada a estandarizar un bioensayo donde se utiliza a *Fasciola hepática* como organismo modelo. En el proyecto se realizan un conjunto de actividades metódicas y técnicas para recabar la información y datos necesarios sobre el tema señalado y el problema a resolver.

2.2 Tipo de Investigación

La presente investigación fue exploratoria dado que se indagaron nuevos datos permitiendo conocer sobre la situación de esta enfermedad. La investigación proporcionó datos importantes que deberán ser tomados en cuenta para generar acciones que permitan reducir la prevalencia de esta enfermedad en los bovinos y de esta forma reducir también bajas en rendimiento a el camal en donde se pudo acceder para obtener la forma adulta del parásito.

2.3 Muestra

En esta investigación se obtuvieron hígados infestados con tremátodos a partir de bovinos faenados los días lunes y jueves en el Camal Municipal de Cuenca EMURPLAG durante el mes de mayo del año 2016. Los órganos colectados constituyen una muestra no probabilística.

2.4 Variables

Variable Independiente:	Sustratos biológicos (extractos vegetales)
Variable Dependiente:	Concentración inhibitoria mínima



2.5 ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIHELMINTICA

2.5.1 Técnica de Referencia

En la presente investigación se modificó la técnica de referencia presentada por Uhr-Rahman *et al.*, (2001). Esta metodología ha sido adaptada en varios trabajos científicos a condiciones experimentales específicas, variando medios de cultivo y condiciones de incubación (Vera-Montenegro *et al.*, 2008). El Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca dispone de condiciones adecuadas para desarrollar experimentación a nivel de bioseguridad II, y un número limitado de reactivos e insumos. Por este motivo, la técnica que se presenta a continuación fue adaptada a nuestras condiciones de trabajo, en especial en relación al uso del Medio 199 (Biomerieux), para el mantenimiento de tremátodos. Este reactivo es de importación bajo cadena de frío, por lo que su disponibilidad en el tiempo establecido para el desarrollo de la investigación no fue posible. Por las razones expuestas, la técnica de Uhr-Raman *et al.*, (2001) fue modificada específicamente en el medio de cultivo de mantenimiento del organismo objetivo.

A continuación, se transcribe el ensayo, del cual se obtuvieron los principios para adaptarlo a las condiciones experimentales del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca.

ENSAYO *In-vitro* para la evaluación de actividad antiparasitaria de sustratos vegetales ante *Fasciola hepática*.

Materiales:

1. Helmintos (gusanos) de *Fasciola hepática* obtenidos a partir de hígados de bovinos infectados en los mataderos.
2. Medio de mantenimiento:
Medio 199, Bio-Merieux en solución concentrada.



Bicarbonato de sodio, solución 5,5%.

Filtrado de suero de caballo

Solución de glucosa al 30%

Agua destilada C.S.P

El pH es ajustado entre 8,2 y 8,5 usando NaOH 0.1N

3. Penicilina
4. Estreptomicina
5. Eritrocitos estériles de ovejas
6. Helenin (medicamento antihelmíntico estándar)
7. Santonin (medicamento antihelmíntico estándar)
8. Microscopio de disección
9. Aparato de disección
10. Jeringas
11. Baño de agua
12. Muestra de prueba (extracto crudo, producto natural puro o compuesto sintético).

El ensayo de antihelmínticos implica la siguiente secuencia de pasos:

1. Los hígados de bovinos infectados se obtienen de los mataderos y se transportan inmediatamente al laboratorio donde los gusanos son disecados antes de que la temperatura de los hígados reduzca significativamente.
2. Hay que tener cuidado de no lesionar los gusanos frágiles. En caso de una infección múltiple la *Fasciola* es separada del *Dicrocoelium* (las características de investigación pueden ser obtenidas de zoología o del departamento de medicina veterinaria)
3. Los trematodos son colocados en un medio de mantenimiento y se mantienen en un baño de agua a 37°C.



4. En el momento de utilización de las sustancias química (medio estéril) debe adicionar:

Penicilina	100,000 UI
Estreptomicina	25mg
Eritrocitos estériles de oveja	1ml

5. Los gusanos son lavados en cuatro cambios de medio estéril por agitación suave y decantación. Dos o tres trematodos se colocan en una caja Petri estéril que contenga 50 ml de medio al que hay que añadir 400,000 unidades de penicilina, y se los deja ahí por 30 minutos a 37°C.

6. Los experimentos con trematodos se llevan a cabo bajo estas condiciones, estarán bajo vigilancia durante tres días y cualquier espécimen muerto se descarta.

7. La vitalidad de los trematodos es determinada por observación de sus movimientos con un microscopio de disección.

8. En el tercer día los trematodos sobrevivientes se someten a diversas concentraciones de la muestra de ensayo y de uno de los dos fármacos de referencia, helenina o santonina.

9. Varias concentraciones de las muestras de ensayo son evaluadas.

Veinticuatro horas después de los ensayos se adicionan a las placas Petri que contienen medio y gusanos, el efecto de estos productos se observa bajo un microscopio binocular (**Rahman & col, 2011**).

2.5.2 Estandarización de la técnica de referencia y adaptaciones a las condiciones experimentales del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca



- **Formulación del medio de mantenimiento para tremátodos***

Composición	Cantidad para 500 mL (g)
Cloruro de Sodio	2.5
Levadura	1
Peptona de caseína	2.5

Tabla 2. Formulación del Medio de Nutritivo

* El medio de cultivo fue esterilizado en autoclave (121°C, 1.5 psi). Cuando alcanzó la temperatura ambiente, se adicionó medio Global para Fertilización (5% v/v). Este medio se usa para cultivo y fertilización de oocitos humanos. Se trata de un medio suplementado de proteínas, tamponado con bicarbonato de sodio, suplementado con veinte aminoácidos, glucosa, lactato y piruvato. Este medio fue donado por una clínica de fertilización “in vitro”, por la cercanía a su fecha de caducidad.

- **Extracción de Tremátodos**

1. Selección de los parásitos a partir de hígados vacunos infestados
2. En cada hígado realizar diferentes cortes para obtener las formas viables del parásito, observando las características anatomo-patológicas causadas por el parásito.
3. Colocación de cada forma adulta en el respectivo medio

- **Pruebas de viabilidad de tremátodos en el medio de mantenimiento**

Para verificar la supervivencia de los organismos de prueba en el medio formulado para el desarrollo del bioensayo, se realizaron algunas pruebas antes de enfrentar a los tremátodos con los tratamientos experimentales.

Se ensayaron las siguientes condiciones:

- a. Organismos de prueba en tubos falcon, a 37 °C, en baño María



- b. Organismos de prueba en placas Petri, a 37 °C, en estufa

Las condiciones que permitieron el 100% de viabilidad de los tremátodos fueron aplicadas para el desarrollo del bioensayo.

- **Preparación de soluciones de extractos y controles**

Soluciones Madre: Las soluciones madre de los extractos vegetales a ensayar se ajustaron a una concentración de 100 000 ug/mL, pesando 100 mg y disolviendo con Metanol, Éter de Petróleo, Diclorometano y Acetato de Etilo, hasta un volumen de 1 mL.

Soluciones de Trabajo: Se realizaron diluciones de la solución madre con el medio de cultivo formulado para el bioensayo. Las concentraciones se ajustaron a 5000, 2500 y 1250 ug/mL. Estas soluciones se prepararon en condiciones de esterilidad, ajustando a un volumen de 1 mL.

2.5.3 Desarrollo del bioensayo de actividad antiparasitaria

1. Las soluciones de trabajo de los extractos en estudio fueron redisueltas en el medio de mantenimiento en los compartimientos de placas bi-petri. Se alcanzó un volumen final de 10 mL, por lo cual las concentraciones de extracto en el ensayo fueron: 500, 250 y 125 ug/mL.
2. Adicionalmente, se preparó un control positivo con albendazol, a partir de una solución madre de 2000 ug/mL, procediendo a la dilución en placa descrita en (1). La concentración final del control positivo para el ensayo fue de 50 ug/mL.
3. Cada concentración de extracto fue ensayada por triplicado. En el ensayo se consideró, además del control positivo, un control negativo con medio de mantenimiento de tremátodos
4. En cada compartimento de las placas se colocaron cinco parásitos viables, previamente enjuagados en medio de mantenimiento.
5. Cada prueba permaneció en incubación a 37 °C durante 24 horas en condiciones aerobias. La viabilidad de tremátodos fue verificada a las 8, 12 y



24 horas. Todos los procedimientos se realizaron en condiciones asépticas bajo cámara de flujo laminar.

INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA

A las 24 horas después de la exposición se evaluó la viabilidad de tremátodos. La actividad se midió mediante la comparación de la supervivencia de los organismos de prueba en los medios con extracto con relación a los del grupo de control. En cada evaluación, los parásitos sin motilidad indicaron la actividad antiparasitaria del tratamiento.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 RESULTADOS

3.1.1 VIABILIDAD DE TREMÁTODOS EN EL MEDIO DE MANTENIMIENTO FORMULADO PARA EL BIOENSAYO

Según lo descrito en la sección de metodología, se ensayaron dos condiciones experimentales para mantener viables a los parásitos durante las condiciones del bioensayo.

En el primer tratamiento se utilizaron tubos falcon de 50 mL y un baño María para mantener la temperatura del ensayo en 37 °C. En estas condiciones los tremátodos se acumularon en el fondo del tubo, sin posibilidad de movimiento, y su viabilidad fue menor de 24 horas.



Fotografía 1. Formas adultas de *Fasciola hepática* en tubo falcon.

Cuando los organismos de prueba fueron colocados en placas Petri tuvieron mejores condiciones de motilidad y disponibilidad de nutrientes del medio, por lo que superaron el tiempo de viabilidad de 24 horas. La temperatura de crecimiento fue generada en una estufa de incubación, evitando posibles contaminaciones con el agua del baño María.



Fotografía 2. Formas adultas de *Fasciola hepática* en caja Petri

3.1.2 ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE EXTRACTOS DE *XENOPHYLLUM HUMILE*

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en el ensayo de actividad antiparasitaria para cuatro extractos orgánicos de *Xenophyllum humile*. La actividad antiparasitaria es expresada en porcentaje de eficacia.

	Extractos orgánicos de <i>Xenophyllum humile</i>				Control positivo	Control negativo
Dosis de prueba (ug/mL)	Éter de petróleo	Acetato de Etilo	Diclorometano	Metanol	Albendazol	Medio de mantenimiento
500	100%	100%	100%	100%	-	-
250	100%	100%	100%	100%	-	-
125	100%	75%	100%	100%	-	-
50	-	-	-	-	100%	-
NA	-	-	-	-	-	0%

Tabla 3. Actividad antiparasitaria de extractos orgánicos de *Xenophyllum humile*. NA: No disponible. (-): No probado



Fotografía 3. Resultados obtenidos de las motilidad de los tremátodos.



3.2 DISCUSIÓN

3.2.1 FORMULACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DE MANTENIMIENTO DE TREMÁTODOS

El medio descrito en la técnica de referencia presentada por Uhr-Rahman no fue utilizado en el bioensayo. El medio de mantenimiento 199 Bio-Merieux es un reactivo que no se encuentra en stock en las proveedoras ecuatorianas. Su importación implica transporte en cadena de frío, por lo que su adquisición hubiese requerido de un tiempo mayor al establecido para el desarrollo de esta investigación.

Para superar la dificultad que presentó el no disponer de este medio, recomendado para el desarrollo del bioensayo, se probaron algunas alternativas disponibles en las condiciones del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca. La revisión de literatura desarrollada para este trabajo permitió establecer que los medios recomendados para el mantenimiento de huevos y tremátodos de *Fasciola hepática* tenían alta disponibilidad de nutrientes y suplementos adecuados para la viabilidad de organismos vivos. Tras varias pruebas se logró formular un medio nutritivo enriquecido con el suplemento Global for Fertilization®. Este suplemento contiene sales minerales, glucosa, piruvato de sodio, aminoácidos, EDTA y Rojo de Fenol como indicador de pH. Este medio se utiliza para incubar oocitos en los procesos iniciales de fertilización “in vitro”.

Normalmente, estos suplementos se descartan cuando la fecha de caducidad se encuentra cercana, para no correr riesgos en el proceso de fertilización “in vitro”. En nuestro estudio, este medio fue incorporado al caldo nutritivo preparado en el laboratorio resultando así una combinación eficaz para que las formas parasitarias presenten mayor tiempo de viabilidad.



3.2.2 INTERPRETACIÓN DEL ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA

La eficacia se evaluó en función del número de duelas vivas y muertas después de 8, 12 y 24 horas de exposición. Los extractos orgánicos de *Xenophyllum humile* se prepararon en concentraciones diferentes (500, 250 y 125 ug/mL) con el fin de calcular su poder fasciolicida en porcentaje tras los resultados obtenidos.

En el grupo control los gusanos conservaron sus características de motilidad, mientras que con los cuatro extractos obtenidos a partir de *Xenophyllum humile* se produjo la muerte de casi todos los especímenes tras 24 horas de incubación, coincidiendo esto con lo observado en el medio preparado con Albendazol que provocó la muerte de todas las *Fasciola hepática* en el mismo período de tiempo.

Representando los resultados en porcentajes se conoce que existió una eficacia del 100% con los extractos de 500 y 250 ug/mL de concentración.

Al comparar los extractos, con el albendazol a una concentración de 50 ug/mL, se pudo confirmar una eficacia del 100% del fármaco, cabe señalar que el propósito de elegir sustancias naturales es evitar los efectos secundarios que el antiparasitario (albendazol), ocasiona sobre los seres humanos.

3.2.3. ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE *Xenophyllum humile*

El bioensayo con los extractos orgánicos se realizó con la finalidad de observar la morbilidad de los parásitos, se optó por *Xenophyllum humile* para llevar a cabo esta prueba, considerando a su vez que este tipo de planta solo presenta descripción botánica sin revisión fitoquímica en su bibliografía, con estudios posteriores se podrá indagar sobre su actividad farmacológica, considerando que en nuestra investigación solo se estableció el primer escalón de la fase preclínica de la actividad antiparasitaria de *Fasciola hepática* y con siguientes proyecciones se verificará la acción terapeuta así como su dosis tóxica si se presentara el caso.



CONCLUSIONES

- En la presente investigación se desarrolló una prueba “*in vitro*” para evaluar la actividad antihelmíntica de extractos vegetales, con la cual se puede valorar el potencial de las plantas de nuestra región ante un parásito prevalente en ganado, considerado un problema de seguridad alimentaria, como *Fasciola hepatica*.
- Se logró adaptar la técnica de actividad antihelmíntica descrita por Uhr-Rahman en las condiciones experimentales que ofrece el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas, ya que el mismo cuenta con la disponibilidad de equipos y materiales, así como de reactivos necesarios para llevar a cabo dicho ensayo.
- Al evaluar la actividad antihelmíntica de los extractos vegetales de *Xenophyllum humile*, se observó una efectividad del 100% en la inhibición de motilidad del organismo objetivo durante las 24 horas de experimentación, en el extracto metanólico, diclorometánico y de éter de petróleo. El extracto de acetato de etilo presentó una actividad moderada de 75%. Los extractos orgánicos de *X. humile* fueron comparados con el fármaco de referencia, albendazol.



RECOMENDACIONES

En base a lo efectuado en el bioensayo se puede sugerir las siguientes recomendaciones:

1. Aplicar la técnica desarrollada en esta investigación para evaluar la actividad antiparasitaria de otras especies vegetales abundantes en nuestra región, con usos tradicionales como antiparasitarios.
2. Realizar en una etapa posterior investigaciones que permitan conocer la composición química de los extractos orgánicos de *Xenophyllum humile* y aproximarse al compuesto o grupo de compuestos responsables de la actividad biológica.
3. Los resultados obtenidos en esta investigación corresponden a la etapa preclínica del desarrollo de un bioproducto. Se recomienda continuar con este estudio que ha generado resultados promisorios, los cuales pueden guiar al desarrollo de un antiparasitario de uso veterinario.



GLOSARIO

Alérgeno: Es una sustancia que puede inducir una reacción de hipersensibilidad (alérgica) en personas susceptibles que han estado en contacto previamente con él.

Anatomopatología: Es la rama de la medicina que se ocupa del estudio, por medio de técnicas morfológicas, de las causas, desarrollo y consecuencias de las enfermedades.

Arbórea: que se parece o es relativa a un árbol.

Artrópodos: Invertebrados de simetría bilateral y cuerpo en segmentos. Constituyen el grupo más numeroso del reino animal, tanto en cantidad de especies como individuos. Sus principales características son poseer apéndices articulados, exoesqueleto, aparato digestivo completo, aparato circulatorio abierto, respiración por tráqueas, aparato excretor constituido por glándulas verdes o un número variable de tubos de Malpighio. Tiene el sistema nervioso con un cerebro dorsal y órganos sensoriales bien desarrollados que comprenden ojos, antenas táctiles, órganos de equilibrio, órganos auditivos y cerdas sensoriales.

Cápsula Glisson: Es una cápsula fibrosa (de colágeno) que recubre la superficie externa del hígado. Está cubierta por una monocapa de células mesoteliales.

Ciclo de vida: Ciclo o serie de fases por las que pasa o transcurre un fenómeno periódico hasta que se reproduce una fase anterior. Vida de un parásito

Cola Bifurcada: Cola dividida en dos lóbulos distintos; emarginada: borde de la cola cóncavo; redondeada, borde de la cola convexo; truncada, borde de la cola recto; semilunar: borde de la cola cóncavo profundo, en forma de media luna; lanceolada: borde de la cola puntiagudo en el extremo medio.



Colangiopancreatografía: Estudio diagnóstico y terapéutico del páncreas y la vía biliar, combina la endoscopia con los Rayos X para su realización, el gastroenterólogo es el especialista que suele practicarlo.

Compuestos bioactivos: Tipo de sustancia química que se encuentra en pequeñas cantidades en las plantas y ciertos alimentos (como frutas, verduras, nueces, aceites y granos integrales). Los compuestos bioactivos cumplen funciones en el cuerpo que pueden promover la buena salud.

Digenético: Se trata de gusanos parásitos provistos de dos ventosas, una oral y otra ventral. Los adultos parasitan especialmente el tubo digestivo, pero pueden infestar cualquier órgano de todas las clases de vertebrados.

Endemismo: Hecho de tener una especie de planta o animal un área de distribución única y limitada.

Eosinofilia: Es una enfermedad en la que el nivel de eosinófilos, uno de los cinco tipos de glóbulos blancos que nos ayudan a combatir otras enfermedades, está más alto de lo normal.

Estróbilo: Hace referencia a cestodos; es el nombre de su parte posterior, en forma de cinta segmentada.

Esclerotina: Sustancia derivada de la acción de polifenoles sobre las proteínas de la exocutícula, que tiene la propiedad de dar rigidez a las partes duras del tegumento.

Esporocisto: Toda estructura que contiene esporas o células reproductoras.

Faenamiento: Es el proceso ordenado sanitariamente, para el sacrificio de un animal, con el objeto de obtener su carne en condiciones óptimas para el consumo humano. Se lo debe llevar a cabo siguiendo normas sanitarias

Fasciolasis: Es una zoonosis causada por el trematodo *Fasciola hepatica*, que afecta a animales vertebrados herbívoros (vacas, ovejas, cabras, entre otros) y a humanos. La infección se adquiere debido a la ingesta de diversos vegetales



acuáticos crudos, algunos terrestres, o agua contaminada con metacercarias, la forma infectiva.

Hermafrodita: Se aplica al ser vivo que reúne en un mismo individuo los órganos sexuales masculino y femenino.

Hematófagos: Animal que tiene hábito de alimentación a través de la sangre de otro animal.

Metabolitos secundarios: compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es letal para el organismo, al contrario que los metabolitos primarios. Los metabolitos secundarios intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente.

Metástasis: Reproducción o extensión de una enfermedad o de un tumor a otra parte del cuerpo.

Miracidio: Larva de algunos platelmintos tremátodos de cuerpo sacciforme, recubierto de cilios vibrátiles.

Microclima: es un clima local de características distintas a las de la zona en que se ubica. Es un conjunto de patrones y procesos atmosféricos que caracterizan un entorno o ámbito reducido.

Montículos: pequeña colina o loma, que suele encontrarse aislado. Puede estar realizado por el hombre o por la naturaleza.

Neumonitis: La neumonitis forma parte de un conjunto de enfermedades denominadas enfermedades pulmonares intersticiales. Éstas son enfermedades que causan inflamación crónica y cicatrices en los alvéolos (sacos aéreos) y las estructuras que los soportan (el intersticio). Estas cicatrices no permiten que los alvéolos transfieran adecuadamente el oxígeno al torrente sanguíneo. En algunos casos, se acumula líquido en el espacio pulmonar, lo que complica aún más el proceso respiratorio.



Parasitosis: Enfermedad infecciosa causada por protozoos, vermes o artrópodos. Las parasitosis son estudiadas por la parasitología y no se consideran parasitosis las infecciones por hongos, bacterias o virus, estudiados por la microbiología.

Proglotido: Segmento sexual de una tenia adulta, que contiene órganos reproductores tanto femenino como masculino.

Prolíficos: Facilidad para reproducirse rápidamente.

Rizomas: tallo subterráneo con varias yemas que crecen de forma horizontal emitiendo raíces y brotes herbáceos de sus nudos. Los rizomas crecen indefinidamente.

Segregado: Separar o apartar una cosa de otra de la que forma parte.

Serpiginoso: Toda lesión o ulcera que cicatriza por un extremo y progresa por el otro

Scolex: Extremo anterior de la *Taenia* constituido por la cabeza y los órganos de fijación.

Tremátodo: m. pl.ZOOL. Clase de gusanos platelmintos parásitos de otros animales y provistos de órganos de adhesión (ganchos o ventosas).

Vitelógenos: Dícese de las glándulas del aparato reproductor femenino en el cual se forma las células vitelinas, como en los platelmintos.

Vitelaria: Estructuras de muchos platelmintos que producen células vitelógenas que proporcionan nutrientes y materiales para la cubierta del embrión.



ABREVIATURAS:

cm: Centímetros

° C: Grados Celsius

µg: Microgramos

g: Gramos

mL: Mililitros

UI: Unidades Internacionales

AgES: Antígenos de excreción-secreción

IgG₂: Inmunoglobulina G₂

AcM78: Anticuerpo Monoclonal

AcOEt: Acetato de Etilo

DCM: Diclorometano

MeOH: Metanol

SM: Solución Madre

mg: Miligramo

kg: Kilogramo



BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado, J., (2016). *Trematodiasis de transmisión alimentaria*. 28 de mayo 2016, de Revista. Sitio web: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs368/es/>
- Álvarez–Mercado & col. (2015). *In vitro antihelmintic effect of fifteen tropical plant extracts on excysted flukes of Fasciola hepatica*. 02 de junio de 2016, de BMC Veterinary Research Sitio web: <http://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-015-0362-4>
- Arteaga, F., (2013). *Determinación de Prevalencia de Fasciola hepática en Bovinos en los Camales Municipales de las Ciudades de Tulcán y San Gabriel – Provincia del Carchi*. Tesis previa a la obtención del título de Ingeniero en Desarrollo Integral Agropecuario, Universidad Politécnica Estatal del Carchi, Tulcán.
- Botero, D. Restrepo, M. (2012). *Parasitosis Humana*. (Quinta Edición). Medellín: Fondo Editorial CIB, p.340-343.
- Carpio, N. Terashima, A. (2012). *Prevalencia de infección humana por Fasciola hepática en pobladores del distrito de Caujul provincia de Oyon, región de Lima, Perú*. 28 de mayo de 2016, de Acta médica peruana Sitio web: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1728-59172008000200006&script=sci_arttext
- Chávez, A. & col. (2012). *Resistencia a antihelmínticos y prevalencia de fasciolosis bovina en la ganadería lechera de Jauja, Perú*. 28 de mayo de 2016, de Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú Sitio web: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172012000100011&script=sci_arttext



- Carrada, T., (2010). *Fasciola hepática: Ciclo biológico y potencial biótico*. mayo 29, 2016, de Revista mexicana de Patología Clínica. Sitio web: <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2007/pt071f.pdf>
- Godoy, T., (2011). *Tremátodos. Descripción*. mayo 29, 2016, de Revista mexicana de Patología Clínica. Sitio web: http://www.fcnym.unlp.edu.ar/catedras/parasitologia_general/pdf/TP9.pdf
- Chávez, A. & col. (2012). *Resistencia a antihelmínticos y prevalencia de fasciolosis bovina en la ganadería lechera de Jauja, Perú*. 28 de mayo de 2016, de Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. Sitio web: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172012000100011&script=sci_arttext
- Chalco, Y., (2012). *Fasciolosis hepática en Humanos, Mexico*. 30 de mayo 2016, Revista de Enfermedades en Humanos. Sitio web: <http://www.monografias.com/trabajos73/fasciolosis-hepatica-humanos/fasciolosis-hepatica-humanos2.shtml>
- Déborah, C., (2014). *Instituto Plan Agropecuario de Fasciola hepática*. 30 de mayo 2016. Revista de Sanidad Veterinaria. Sitio web: http://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R109/R109_48.pdf
- Espinoza, J. & col. (2010). Fasciolosis humana y animal: impacto en la economía de las zonas endémicas. *Zoonosis parasitaria*, Vol. 27 (Núm. 4), p. 604 - 612.
- García, I. & col., (2010). *Manual de laboratorio de Parasitología - Cestodos*. mayo 27, 2016, de Revista Reduca (biología) web: <http://elygomez.aprenderapensar.net/files/2016/04/09.-Cestodos.pdf>



- Gonzales, C. & col. (2013). *Control de Fasciola hepática en el agua de consumo animal a través de filtración rápida y lenta*. 28 de mayo de 2016, de Escuela de Ingeniería de Antioquia Sitio web: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-12372013000100012
- Gonzales, C., (2013). *Control de Fasciola hepática en el agua de consumo animal a través de filtración rápida y lenta*. mayo 29, 2016, de Revista Escuela de Ingeniería de Antioquia. Sitio web: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-12372013000100012
- Jaramillo, R. (2014). Estudio del punto de congelamiento en las plantas altoandinas *Werneria nubigena* (Kunth) y *Xenophyllum humile* (Kunth). 02 de junio de 2016, de Congreso latinoamericano de Botánica. Sitio web: <http://www.botanica.org.br/trabalhos-cientificos/65CNBot/8856-FVG.pdf>
- Martínez, R. & col. (2012). *Fascioliasis, revisión clínico-epidemiológica y diagnóstico*. 28 de mayo de 2016, de Revista cubana de Higiene y Epidemiología Sitio web: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032012000100011
- Moscoso, D., (2014). *Prevalencia de Fasciola hepática en bovinos faenados en el Camal Municipal de Pelileo provincia de Tungurahua*. Tesis previa a la obtención del título de Médico Veterinaria, Universidad Técnica de Ambato, Ambato.
- Prepelitchi, L., (2011). *Ecoepidemiología de Fasciola hepatica (Trematoda, Digenea) en el norte de la Provincia de Corrientes destacando aspectos ecológicos de Lymnaea columella (Pulmonata, Lymnaeidae) y su rol como*



hospedador intermediario. Tesis previa a la obtención del título de Doctor en Ciencias Biológicas, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.

- Perez, A. Andrade, J. López, J. (2013). Helmintos y aparato respiratorio. Archivos de Bronconeumología, vol 42. Sitio web: <http://www.archbronconeumol.org/pt/helminetos-aparato-respiratorio/articulo/13084399/>
- Pereira, A. (2014). Trematodosis hepáticas. Parasitología, Vol. 23 (Núm., 4), p. 116-124.
- Rahman, A. Iqbal, M. Thomsen, W. (2011). *Bioassay Techniques for Drug Development*. (Tercera Edición). Amsterdam: Overseas Publishers Association, p. 88-89
- Roverano, A., (2013). *Parasitología: Programa de Zootecnia*. 29 mayo 2016, Sitio web: <https://es.scribd.com/doc/304907145/CLASE-CESTODOS-pdf>
- Sampedro, W., (2013). *Diagnostico endoparasitario y evaluación antihelmintica para su control en dos comunidades de la Parroquia Cebadas del Cantón Guamate*. Tesis previa a la obtención del título de Ingeniero Zootecnista, Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, Riobamba.
- Satalaya, J & col. (2012). Actividad antiparasitaria de plantas medicinales de la Amazonía. Sitio web: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S181353632009000200004&script=sci_arttext
- Torrel, T, (2013). *Parasitología veterinaria*. Tesis previa a la obtención del título de Médico Veterinario, Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca.



- Torres, L., (2010). *Utilización del chocho (Lupinus mutabilis Sweet) como antiparasitario intestinal y hepático de ovinos mestizos*. Tesis previa a la obtención del título de Ingeniera Zootecnista, Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, Riobamba.

- Ulloa, C. (2010). Cien plantas silvestres de páramo. (Segunda Edición). Cuenca: Monsalve Moreno, p. 10-12, 25-26.

- Uribarren, T., (2015). *Generalidades de céstodos*. mayo 27, 2016, de Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Sitio web: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/cestodos.html>

- Van den Brink, M. (2010). *Peru, Northern part: Cordillera Blanca*. 02 de junio de 2016, de Photos from around the world Sitio web: <http://photos.v-d-brink.eu/Flora-and-Fauna/South-America/Peru-Northern-part/i-H9NfW6h>

- Valencia, R. Balslev, H. (2011). *Estudios sobre diversidad y ecología de plantas* (Primera Edición). Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador en colaboración con Universidad de Aarhus, Dinamarca.

- Vinueza, P. (2014). *Influencia de la parasitosis en el estado nutricional de niños en etapa escolar de 5-12 años*. Trabajo de grado de licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito. Sitio web: <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/7705/Tesis%20Paulina%20Vinueza.pdf?sequence=1&isAllowed=y>



ANEXOS

ANEXO 1. CÁLCULOS

1.1 Cálculos para preparar diluciones de extractos.

Todas las soluciones se formulan como sigue:

Soluciones madre (SM): pesar 100 mg y disolver en 1ml de (DCM, MeOH, AcOEt, Éter de petróleo)

$$SM = 100 \text{ mg} \times \frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{mg}} = 100000 \mu\text{g/ml}$$

Concentración Soluciones de trabajo: 5000 $\mu\text{g/ml}$

$$2500 \mu\text{g/ml}$$

$$1250 \mu\text{g/ml}$$

Fórmula para conocer el volumen de SM que se debe utilizar para cada dilución de las soluciones de trabajo

- **Solución 1: $V_1C_1 = V_2C_2$**

$$V_1 \times 100000 \mu\text{g/ml} = 1 \text{ml} \times 5000 \mu\text{g/ml}$$

$$V_1 = 50 \text{ml}$$

- **Solución 2: $V_1C_1 = V_2C_2$**

$$V_1 \times 100000 \mu\text{g/ml} = 1 \text{ml} \times 2500 \mu\text{g/ml}$$

$$V_1 = 25 \text{ml}$$

- **Solución 3: $V_1C_1 = V_2C_2$**



$$V_1 \times 100000 \mu g/ml = 1ml \times 1250 \mu g/ml$$

$$V_1 = 12,5ml$$

PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

- Solución de 5000 $\mu g/ml$: tomar 50 ml de SM y diluir a 1ml con el Medio de Mantenimiento
- Solución de 2500 $\mu g/ml$: tomar 25 ml de SM y diluir a 1ml con el Medio de Mantenimiento
- Solución de 1250 $\mu g/ml$: tomar 12,5 ml de SM y diluir a 1ml con el Medio de Mantenimiento

PREPARACIÓN DE CONTROL POSITIVO

Concentración fármaco de referencia (Albendazol): 100 mg / 5 mL

En 100 μL se tienen 2000 μg de principio activo.

Al mezclar 100 μL de Albendazol con 900 μL de medio nutritivo se tiene una solución de concentración 2000 $\mu g/mL$.

- Solución Madre Control Positivo: 2000 $\mu g/mL$
- Solución de trabajo: 500 $\mu g/mL$
Tomar 250 μL de la solución madre y diluir con 750 μL de medio de cultivo.
- En el bioensayo: Mezclar en la caja Petri 1 mL de solución de trabajo con 9 mL de medio de cultivo. La concentración final del control positivo en el bioensayo es 50 $\mu g/mL$.



ANEXO 2. LECTURA DE RESULTADOS

	Extractos orgánicos de <i>X. humile</i>				Control positivo	Control negativo
Dosis de prueba (ug/mL)	Éter de petróleo	Acetato de Etilo	Diclorometano	Metanol	Albendazol	Medio de mantenimiento
500	+++++	+++++	+++++	+++++		
250	+++++	+++++	+++++	+++++		
125	+++++	+++++	+++++	+++++		
50					+++++	
NA						-----

Tabla 4. Resultados de la Motilidad de los Tremátodos. NA: No disponible. (+): Parásitos muertos. (-): Parásitos vivos

	Extractos orgánicos de <i>X. humile</i>				Control positivo	Control negativo
Dosis de prueba (ug/mL)	Éter de petróleo	Acetato de Etilo	Diclorometano	Metanol	Albendazol	Medio de mantenimiento
500	+++++	+++++	+++++	+++++		
250	+++++	+++++	+++++	+++++		
125	+++++	+++++	+++++	+++++		
50					+++++	
NA						-----

Tabla 5. Resultados de la Motilidad de los Tremátodos Duplicado. NA: No disponible. (+): Parásitos muertos. (-): Parásitos vivos

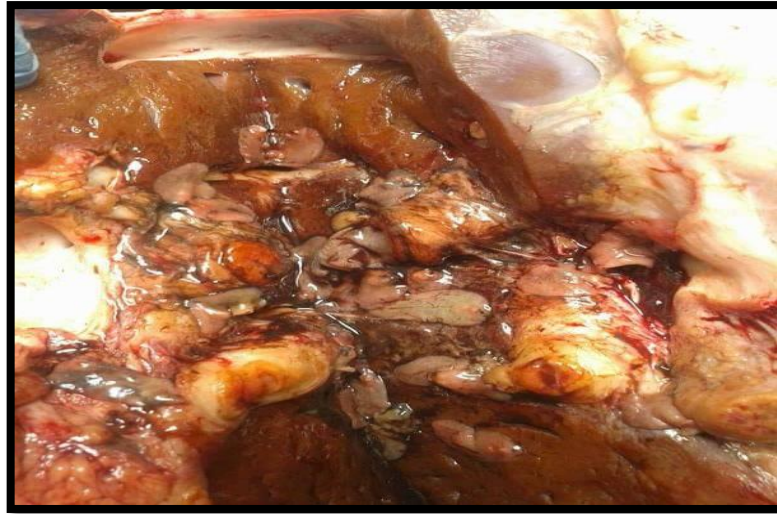


	Extractos orgánicos de <i>X. humile</i>				Control positivo	Control negativo
Dosis de prueba (ug/mL)	Éter de petróleo	Acetato de Etilo	Diclorometano	Metanol	Albendazol	Medio de mantenimiento
500	+++++	+++++	+++++	+++++		
250	+++++	+++++	+++++	+++++		
125	+++++	+++++	+++++	+++++		
50					+++++	
NA						-----

Tabla 6. Resultados de la Motilidad de los Tremátodos Triplicado. NA: No disponible.

(+): Parásitos muertos. (-): Parásitos vivo

ANEXO 3. GALERÍA FOTOGRÁFICA



Fotografía 4. Hígado infestado con Formas Adultas de *Fasciola hepática*

Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca.

Fecha: 06/06/2016

Cecilia, T & Tatiana V. (2016)

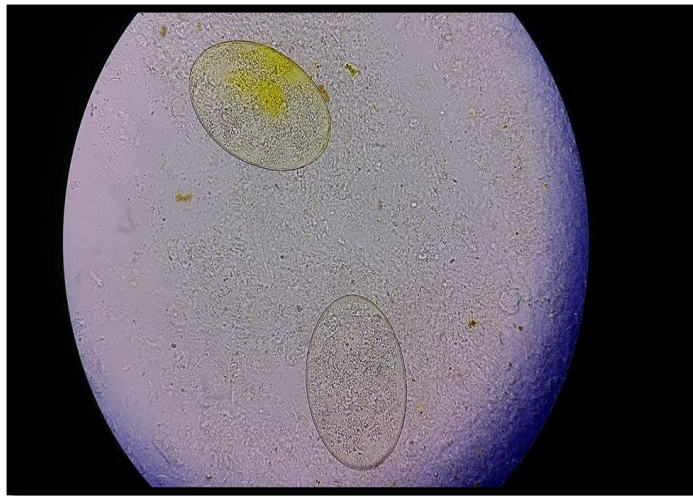


Fotografía 5. Cortes del Hígado parasitado.

Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca.

Fecha: 06/06/2016

Cecilia, T & Tatiana V. (2016)



Fotografía 6. Observación microscópica de huevos de *Fasciola hepática*

Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca.

Fecha: 06/06/2016

Cecilia, T & Tatiana V. (2016)



Fotografía 7. Forma Adulta de *Fasciola hepática*

Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca.

Fecha: 06/06/2016

Cecilia, T & Tatiana V. (2016)

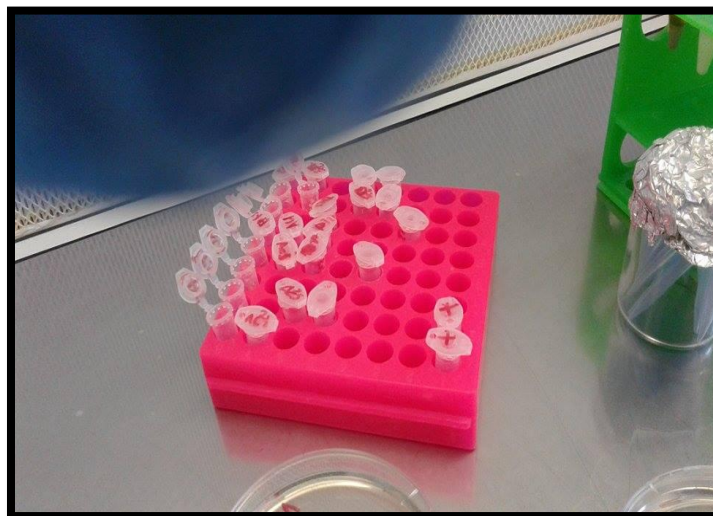


Fotografía 8. Medio de Mantenimiento Global for Fertilization

Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca.

Fecha: 06/06/2016

Cecilia, T & Tatiana V. (2016)



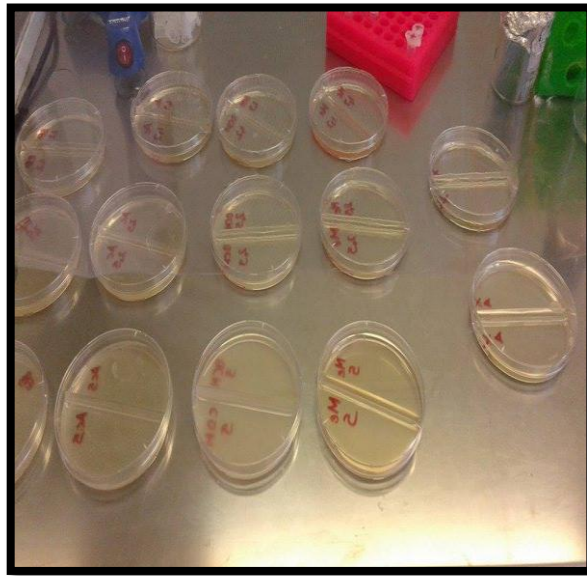
Fotografía 9. Extractos en diferentes concentraciones

Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca.

Extractos en diferentes concentraciones

Fecha: 06/06/2016

Cecilia, T & Tatiana V. (2016)



Fotografía 10. Extractos redissueltos en el medio de mantenimiento.

Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca.

Fecha: 06/06/2016

Cecilia, T & Tatiana V. (2016)



Fotografía 11. Formulación del medio de mantenimiento Global en el medio Nutritivo.

Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca.

Fecha: 06/06/2016

Cecilia, T & Tatiana V. (2016)
