



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
-- IZTACALA --

EVALUACION IN VITRO DE LA EFICACIA
ANTIHELMINTICA DE ALGUNOS COMPUESTOS
QUIMICOS Y NATURALES CONTRA LOS
ESTADIOS INMADUROS Y MADUROS DE
FASCIOLA HEPATICA

TESIS PROFESIONAL
QUE PRESENTA
P. de Biol. Berta Sánchez Estrada
PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O

Asesor: Dr. Froylán Ibarra V.

México, D. F., 1986



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis padres:

Mario Sánchez Rodríguez

y

Concepción Estrada de S.

quienes han sido para mí el mejor ejemplo de superación,
rectitud y perseverancia.

Con todo mi amor y gratitud por el incondicional apoyo
brindado en todas las etapas de mi vida.

A mi tía Asunción:

Un tributo a su generosidad, con mi cariño y agradecimiento.

A mis queridos hermanos:

Gerardo Alberto

y

Gregoria Mercedes

A mi esposo José Luis:

Con mi amor y gratitud por el incalculable
apoyo otorgado durante la carrera, y haber
sabido compartir mis horas de estudio y de
trabajo como un verdadero compañero

A mis hijos:

Mario Ulises

y

Edgar Isaac

razones y alicientes de mi vida

Mi mayor agradecimiento al Dr. Froylán Ibarra
V., Asesor de esta tesis; por todas las facili-
dades otorgadas así como por el apoyo brinda-
do durante la realización de la misma.

Mi sincero agradecimiento a la Sra. Concepción
Uribe, por haber mecanografiado el manuscri-
to de este trabajo.

También quiero agradecer a todas aquellas per-
sonas que de una u otra forma colaboraron para
la realización de esta tesis

Un agradecimiento muy especial a los miembros
del jurado por sus valiosas sugerencias y con-
sejos respecto a la elaboración de este trabajo.

QBP. BERTA HASHIMOTO YAÑEZ

QBP. CESAR GARCÍA

M. EN C. ERNESTO AGUIRRE LEON

BIÓL. MA. DE LOS ANGELES SANABRIA

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL INSTITUTO
NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES
Y AGROPECUARIAS DE LA S.A.R.H, BAJO LA
DIRECCIÓN DEL DR. FROYLÁN IBARRA VELARDE

I N D I C E

TITULO	1
INTRODUCCION.....	2
OBJETIVOS.....	14
MATERIAL Y METODO.....	15
- Escrutinio de compuestos contra fascio- las recién desenquistadas	16
- Escrutinio de extractos vegetales contra fasciolas adultas	18
- Evaluación de resultados	20
RESULTADOS.....	24
DISCUSION.....	39
CONCLUSIONES.....	46
APENDICE I	48
APENDICE II.....	49
BIBLIOGRAFIA.....	50

EVALUACION IN VITRO DE LA EFICACIA ANTIHELMINTICA DE
ALGUNOS COMPUESTOS QUIMICOS Y NATURALES CONTRA LOS
ESTADIOS INMADUROS Y MADUROS DE Fasciola hepatica.

I N T R O D U C C I O N

Fasciola hepatica, conocida comunmente como duela del hígado, es un trematodo cosmopolita que se aloja en los ductos biliares de diferentes mamíferos como son: ovinos, bovinos y caprinos principalmente, aunque también se le ha encontrado parasitando a otras especies domésticas y silvestres, incluyendo al hombre, teniendo entre las especies silvestres a sus reservorios naturales.

El parásito adulto tiene un tamaño variable que oscila entre 18 a 50 mm de largo por 4 a 14 mm de ancho, se caracteriza por poseer un cuerpo de forma foliacea, aplanado dorsoventralmente y cubierto de pequeñas espinas. Presenta un pequeño cono cefálico que remata en una ventosa oral en cuyo fondo se abre la boca, y una ventosa ventral en la base del cono, que funciona únicamente como órgano adhesivo, permitiendo al parásito mantener su posición en el hospedero.

La boca comunica con una faringe muscular que actúa a modo de bomba succionadora durante la alimentación, ésta se continúa con un esófago corto a partir del cual se originan dos ciegos intestinales con muchos divertículos laterales que se extienden hacia ambos lados del cuerpo.

Por ser un endoparásito, la duela del hígado carece de órganos de los sentidos, presentando un sistema nervioso muy simple,

formado por un par de ganglios anteriores de los cuales parten cordones longitudinales que se comunican entre sí.

A través de la cutícula tiene lugar la absorción de aminoácidos, la eliminación de desechos nitrogenados y el intercambio de gases; es anaerobio facultativo, hermafrodita y con un alto potencial biótico. (Gitard et al., 1966; Barnes, 1977; Quiroz, 1984).

Fasciola hepatica es un parásito ampliamente distribuido en el mundo, debido a su gran capacidad hospedatoria, ya que parasita a varias especies de mamíferos; y cuenta entre sus hospederos intermediarios a caracoles pulmonados de muy diversas especies e inclusive de diferente género como son: Lymnaea, Fossaria, Galva y Pseudosuccinea (Furmaga et al. 1967; Gómez et al. 1978; Hadar et al. 1978; Quiroz, 1984).

Al parecer Lymnaea es el género más importante en México - (Landeros et al. 1981; Soulsby, 1982).

Ciclo biológico

El ciclo vital de la duela del hígado es indirecto, pues requiere de un hospedero intermediario para poder completarlo. Las duelas adultas alojadas en los ductos biliares del hospedero definitivo producen entre 20,000 y 50,000 huevecillos diarios, sin embrionar, y hasta durante 11 años en ovinos; en bovinos, la producción declina con el tiempo como consecuencia de la reacción del hospedero después de la infección. Los huevecillos salen del

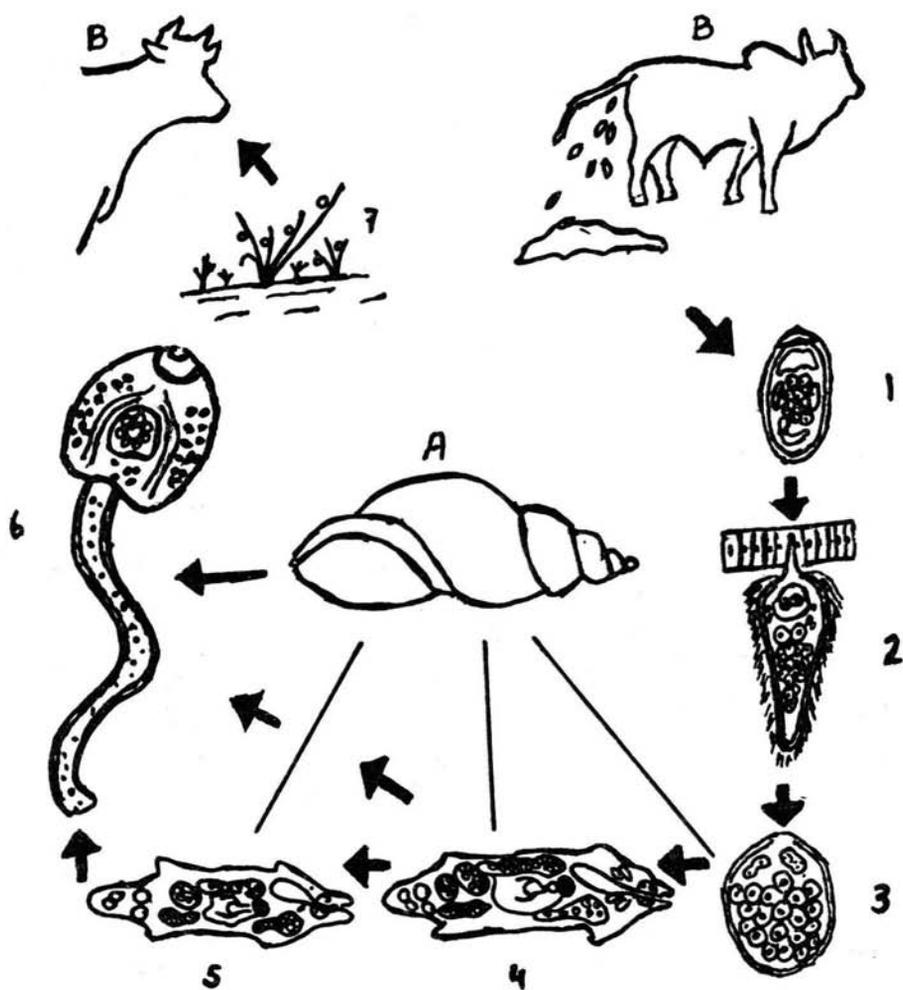
hígado a través del conducto colédoco y pasan al intestino de donde son evacuados con las heces.

Para que puedan embrionar los huevecillos deben ser lavados por la lluvia y arrastrados a algún cuerpo de agua léntico, pues las condiciones anaeróbicas de la masa fecal impiden su desarrollo; ya que requieren de un buen aporte de oxígeno y temperatura apropiada, de 28°C aproximadamente; en estas condiciones los huevecillos eclosionan a los 9 ó 10 días; a temperaturas menores, el desarrollo se retrasa, deteniéndose por completo a temperaturas inferiores a los 10°C, aunque los huevecillos conservan su viabilidad. Son muy sensibles a la desecación y el pH parece no influir sobre la embriogénesis.

Durante la eclosión del huevo el opérculo se abre dejando libre a un miracidio ciliado, el cual posee 2 manchas oculares, que por fototropismo positivo le permiten encontrar a su hospedero intermediario en un lapso de 24 horas como máximo. El miracidio se adhiere a la superficie del caracol, mediante su papila anterior y secreta enzimas digestivas que le permiten introducirse en los tejidos de éste, al penetrar pierde su capa ciliada, transformándose en un esporocisto que migra hacia la glándula hepática del caracol.

Las células germinales del esporocisto producen una cantidad variable de redias, las cuales a su vez producen, también por reproducción asexual, un promedio de 16 a 20 cercarias cada una, dando finalmente un promedio de 9 a 649 cercarias por miracidio.

CICLO BIOLÓGICO DE Fasciola hepatica



1.- Huevecillo

2.- Miracidio

3.- Esporocisto

4.- Redia madre

5.- Redia hija

6.- Cercaria

7.- Metacercaria

A.- Hospedero intermediario

B.- Hospedero definitivo

Las cercarias abandonan al caracol por su aparato respiratorio y buscan inmediatamente donde enquistarse; transformándose - así en la fase infectiva denominada metacercaria. Generalmente - el enquistamiento se realiza sobre plantas, que posteriormente son ingeridas por el hospedero definitivo; en cuyo tracto digestivo - ocurre el desenquistamiento.

El desenquistamiento tiene lugar en 2 etapas, la primera, es un período de activación que comienza en el rumen en una atmósfera de anhídrido carbónico concentrado y una temperatura de 39°C. En el duodeno, la bilis provoca la emergencia de la metacercaria al activar sus enzimas, lo que provoca la abertura del orificio - de emergencia del quiste.

Las duelas recién desenquistadas perforan la pared intestinal, migran a través de la cavidad peritoneal hacia el hígado, penetrando en él a través del lóbulo ventral, principalmente. Tras un período de migración y alimentación en el parénquima hepático, las duelas jóvenes penetran en los ductos biliares, y se autofecundan, empezando la producción de huevecillos a las 8 semanas de edad, - continuando ininterrumpidamente durante toda la vida del parásito (Rowcliffe et al. 1960; Taylor, 1965; Olsen, 1977; Abreu et al. - 1982; Quiroz, 1984).

La duela del hígado, es el agente causal de la fasciolosis, enfermedad muy extendida entre especies domésticas de interés eco

nómico, como ovinos, bovinos y caprinos. Se presenta en forma aguda y crónica, siendo esta última la más común.

La fasciolosis aguda es causada por la invasión masiva del parásito, que generalmente produce la muerte del hospedero, ocasionando de este modo pérdidas directas inmediatas. Aunque lo común es que se presente la fasciolosis crónica causando pérdidas de diferente índole.

Hay pérdidas de lana, ya que cuando los ovinos están parasitados su producción se reduce considerablemente, aparte de que se vuelve quebradiza (Roseby, 1970) en los ovinos causa una disminución en la producción de leche (Black et al., 1972; Quiroz et al., 1973), de carne (Sewell et al., 1968; Ross, 1970; Cawdery et al., 1971; Cawdery et al., 1977); aparte de influir negativamente en la concepción y/o implantación del cigoto (Cawdery, 1976), todo ello como consecuencia de la desnutrición y la mala conversión alimenticia que realizan los animales parasitados.

Hay que añadir a estas pérdidas ya de por sí cuantiosas, los daños indirectos que la duela ocasiona, al propiciar la entrada y establecimiento de gérmenes en las lesiones causadas por la migración de este parásito dentro del parénquima hepático, como es el caso de la enfermedad conocida como cabeza negra (clostridiosis), que es causada por la bacteria Clostridium novyi (Olsen, 1977).

En general, los animales parasitados están también expuestos al ataque de otros parásitos, y son más susceptibles a diversas enfermedades por estar debilitados.

Aunado a esto, las pérdidas por el decomiso de hígados parasitados en los rastros, son cuantiosas, como lo atestiguan numerosos trabajos realizados en diversos lugares de la República Mexicana; que dan idea de la incidencia de la fasciolosis en México - que va desde 4.5% en algunos lugares, hasta 92.5 e inclusive 100% en otros, (González, 1969; Martínez, 1972; Muñóz, 1973; Bonilla, 1974; Dichateau, 1974; Sánchez, 1976; Ciprian, 1977; Gómez et al. 1978; Miranda, 1979; Reyes, 1979; Quiroz, 1984).

Por tratarse de un parásito de gran importancia económica; a la duela del hígado se le ha estudiado ampliamente a nivel bioquímico (Clegg et al., 1966; Prichard et al., 1968; Bennet et al., 1972), inmunológico (Kearney et al. 1967; Sinclair, 1971; Hughes et al., 1973; Harness et al., 1975; Howell et al., 1977; Anderson et al., 1977; Burden et al., 1978; Anderson et al., 1978; Lehner et al., 1980; Doy et al., 1981), fisiológico (Thorsell et al., 1965; Alcaino et al., 1976), epidemiológico (Ross et al., 1968), patológico (Dow, et al., 1967; Roberts, 1968; Rushton et al., 1977), y desde luego quimioterapéutico (Kendall et al., 1962; Colegrave, 1968; Boray et al., 1969; Dimitrov et al., 1970; Dickerson et al., 1971; Dávalos, 1974; Guttowa et al., 1975; Osuna et al. 1977.

Aún cuando se han realizado numerosos estudios a este respec

to, sólo se han desarrollado algunos fasciolícidias comerciales en el mundo, todos ellos productos sintetizados químicamente. Sin - que se haya prestado atención a los productos naturales que pueden ser extraídos de las plantas, no obstante, que uno de los primeros fasciolícidias utilizados en Europa fue obtenido de extractos de Aspidium filix-mas (helecho macho), descubierto por Perroncito en 1881, y utilizado ampliamente en las décadas siguientes, con el - nombre comercial de Distol y Danistol, sin embargo quedó olvidado al descubrirse nuevos fasciolícidias de síntesis química, debido a su bien conocida toxicidad y a que no tiene ninguna acción contra las fases inmaduras del parásito, por lo que resulta ineficiente en los brotes graves; ya que los ovinos fuertemente infestados, - mueren antes de que las duelas hayan alcanzado la fase de desarro - llo en que son susceptibles a la acción parasiticida de la droga. (Taylor, 1965).

Recientemente se ha manifestado algún interés en buscar nue - vos antihelmínticos entre las sustancias naturales de origen vege - tal, con resultados exitosos. Susplugas et al., (1980) encontra - ron que Inula viscosa tiene actividad antihelmíntica contra Fas - ciola hepatica, Syphacia ovelata e Hymenolepis nana var fraterna, asimismo; N'Dounga et al., (1984) reportan la acción parasiticida de Bidens pilosa contra especies de diferentes géneros: Hymenole - pis nana var, fraterna, Fasciola hepatica, Entamoeba histolitica,

Trychomonas vaginalis y Plasmodium falciparum. También se ha probado la acción molusquicida de algunas plantas, que puedan emplearse en el combate del hospedero intermediario de la duela del hígado. (El Hadi et al., 1984).

Aunque los productos sintetizados químicamente han demostrado una aceptable efectividad contra el parásito también presentan algunos inconvenientes tales como:

a) El tener un índice de seguridad más reducido que muchos de los antihelmínticos indicados contra otros helmintos.

b) Su acción selectiva, actúan sólo contra las fases maduras o las inmaduras, pero no las eliminan simultáneamente en forma satisfactoria (Coles 1975; Adachi, 1980; Ibarra 1984).

c) La mayoría de ellos actúan sobre los estados adultos - - (Coles, 1975; Ibarra, 1984).

d) Su eficacia variable, según el tipo de hospedero al que se suministre. (Boray et al., 1967; Coles, 1975; Coles, 1976).

e) Su elevado costo, que impide el empleo sistemático de estos productos durante tiempos razonables para erradicar, o por lo menos controlar al parásito.

En un principio los estudios tendientes a encontrar alguna droga con acción antihelmíntica, se realizaron in vivo y en el hospedero definitivo, pero por las dificultades técnicas y su ele

vado costo, se pensó en emplear animales de laboratorio que son - más fáciles de manejar; y su mantenimiento resulta mucho más económico. Sin embargo se presentaron todavía algunos inconvenientes, como por ejemplo, el hecho de que algunos hospederos del parásito empleados en el laboratorio presentan diferente susceptibilidad al ataque de F. hepatica (Coles, 1975); por lo que se subestima la acción de los fasciolicidas probados en hospederos poco susceptibles, siendo poco confiable la extrapolación de resultados.

Otro de los inconvenientes es que, una misma droga, puede presentar diferente actividad al ser probada en distintas especies de mamíferos; resultando muy efectiva en algunos, y totalmente inactiva en otros (Boray et al., 1967; Coles, 1976).

Por otra parte, se necesitan cantidades relativamente grandes de sustancias químicas, para poder probarse in vivo.

En virtud de las limitaciones que presentan los fasciolicidas comerciales, se manifiesta necesario probar nuevos productos de síntesis química así como extractos vegetales; con el fin de determinar si alguno de ellos tiene potencial como fasciolicida. El costo de esta investigación es muy elevado, por lo cual es necesario contar con un sistema que sea rápido, eficiente y económico, que permita probar simultáneamente gran cantidad de productos; siendo hasta el momento el sistema de probado de compuestos in vitro el único que reúne estas características.

Dicho sistema no había sido utilizado en virtud de no contar con un medio de cultivo que soportara el desarrollo y crecimiento del parásito de manera adecuada.

El primer intento para mantener a F. hepática in vitro, fue realizado con cierto éxito por Stephenson en 1947, citado por Foster (1970), a partir de esa fecha algunos investigadores Foster (1970), Lehner y Sewell (1979) aunaron sus esfuerzos pero en todos los casos sólo se pudo mantener al parásito por unas cuantas horas y en estado latente. No fue sino hasta 1981 en que Smith y Clegg desarrollaron un medio de cultivo en el que pudieron mantener a la duela del hígado in vitro desde su desenquistamiento - hasta las 14 semanas de edad.

Posteriormente, Ibarra (1984) utilizando el medio de Smith y Clegg desarrolló una técnica que le permitió probar gran cantidad de compuestos químicos de conocida acción sobre parásitos gastroentéricos, pulmonares y protozoarios, los cuales no tuvieron efecto fasciolicida o éste fue mínimo. El mismo autor al probar la actividad de algunos fasciolicidas conocidos, encontró que en su mayoría fueron eficaces contra duelas jóvenes y maduras, y sólo dos de ellos tuvieron efecto sobre los parásitos recién desenquistados.

El desarrollo de esta técnica ofrece grandes perspectivas en la búsqueda de nuevos fasciolicidas, por lo que se hace necesario comprobar su sensibilidad probando una vez más, el mayor número -

posible de sustancias, tanto de productos naturales como de síntesis química.

Por este motivo, y teniendo en cuenta que en nuestro país - existe una rica flora en la que abundan las plantas medicinales, muchas de las cuales son ampliamente utilizadas en medicina tradicional como antihelmínticos (Bompard, 1949; Martínez, 1953; Martínez, 1956; Matuda, 1958; Martínez, 1969; Chávez, 1976; Bove, 1977; Del Amo, 1979; Font Quer, 1980; Gallardo, 1983) y otras tantas de conocido efecto tóxico, que también son empleadas en la medicina tradicional (Aguilar y Zolla, 1982); a las cuales no se les ha - prestado la debida atención en lo que respecta al estudio de sus principios activos y menos aún al estudio y comprobación de sus - propiedades antihelmínticas y fasciolicidas concretamente; que se pensó en realizar este trabajo, dando preferencia al probado de - extractos acuosos vegetales contra parásitos recién desenquistados, por ser los más resistentes a los fasciolicidas conocidos; y a los que menos atención se ha prestado en las investigaciones -- realizadas hasta la fecha.

Se decidió trabajar sólo con extractos acuosos a manera exploratoria, debido a que, como ya se mencionó anteriormente, existe en nuestro país una gran cantidad de plantas utilizadas con fines antihelmínticos, siendo empleadas popularmente en forma de infusiones o cocciones; además de resultar un tanto subjetiva la -- elección de una sola de estas plantas para realizar otro tipo de

estudios, por ejemplo mediante extracción química. Considerando por otra parte, que el empleo de un procedimiento sofisticado no siempre es el mejor camino.

O B J E T I V O S

- a) Determinar bajo condiciones in vitro la posible acción fasciolicida de sustancias naturales, obtenidas de extractos vegetales, así como de algunos compuestos de síntesis química.
- b) Probar la sensibilidad de la técnica desarrollada por Ibarra (1984) para el probado in vitro de compuestos en contra de algunos estadios del desarrollo ontogenético de F. hepatica.

M A T E R I A L Y M E T O D O

El presente estudio fue realizado en el Instituto Nacional - de Investigaciones Pecuarias de la S.A.R.H., en la Unidad Central de Palo Alto, D.F.

Se realizó el escrutinio de extractos acuosos de 95 plantas, las cuales se colectaron en diferentes lugares de la República Mexicana; siendo en su mayoría de pretendida acción antihelmíntica, algunas tóxicas y otras de uso variable. Para ello se trabajó con 3 grupos distintos de plantas con el fin de determinar si había - diferencias significativas en su modo de acción contra fasciolas de diversas edades, expuestas estas directamente a los extractos empleando un sistema in vitro.

Las plantas utilizadas en este trabajo se escogieron en base al uso popular que se les dá, reportado en la bibliografía y, al obtenido en entrevistas personales con gente de distintas localidades del Estado de Veracruz, Estado de México, Estado de Hidalgo y Distrito Federal.

La identificación botánica se realizó en los herbarios de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, del Instituto Politécnico Nacional (E.N.C.B.) y del Instituto de Biología de la UNAM, utilizando las claves apropiadas.

Dichas plantas fueron secadas a la sombra y almacenadas has

ta su utilización.

Por otro lado se probaron 11 compuestos de síntesis química con la finalidad de determinar si tenían posible acción antifasciola bajo condiciones in vitro. Estos compuestos no son comerciales y fueron proporcionados por el Proyecto Fasciolosis del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias de la S.A.R.H.

El medio de cultivo empleado fue el de Smith y Clegg (1981) adaptado por Ibarra (1984), compuesto por medio RPMI 1640 conteniendo 50% v/v de suero de ternera, 2% v/v de eritrocitos de conejo 50 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycinina.

ESCRUTINIO DE COMPUESTOS CONTRA FASCIOLAS RECIEN DESENGUISTADAS

La técnica para el desenquistamiento artificial de metacercarias de F. hepatica, se describe en detalle en el apéndice 1.

1) Extractos vegetales:

Después de realizar una serie de pruebas preliminares con el fin de determinar la cantidad apropiada de planta a utilizar, se prepararon los extractos acuosos con 5 g de planta triturada, en 100 ml de agua destilada, sometiéndolos a ebullición durante 5 minutos en vasos de precipitado, y dejándolos reposar por 20 minutos más; al cabo de los cuales se filtraron utilizando papel filtro del No. 1 y se colocaron en tubos de ensaye protegidos de la luz, hasta su utilización. De los extractos acuosos preparados

de esta manera, se hizo una dilución al 50%. Probándose inicialmente dos concentraciones para todas las plantas, éstas fueron de 5 y 2.5 mg de planta/ml; posteriormente se probaron dos diluciones más para las plantas que resultaron activas a las concentraciones anteriores. En los casos en que fue posible se probó la planta tanto en fresco como en seco.

Las duelas recién desenquistadas se desinfectaron durante una hora y media, colocándolas para tal efecto, en medio de cultivo con 50 U/ml de penicilina y 100 ug/ml de estreptomycin. Posteriormente se trasladaron con una micropipeta a cajas multicámaras para cultivo de tejidos con capacidad de 3 ml por pozo, las que previamente contenían 70% de medio de cultivo a base de suero de ternera y medio RPMI 1:1 con antibiótico (50 U/ml de penicilina y 100 ug/ml de estreptomycin), 10% de eritrocitos de ovino al 2%, 10% del medio donde se encontraban las fasciolas (con 10 duelas por pozo) y 10% de la sustancia a probar; dando un volumen final de 2 ml por pozo. Enseguida se incubaron durante 4 días a 37°C con 5% de CO₂, al cabo de los cuales se evaluó el efecto de cada sustancia, realizando las observaciones con ayuda de un microscopio invertido; con el fin de poder apreciar en el medio de cultivo, las diferentes alteraciones sufridas por las duelas.

Las pruebas se realizaron por duplicado, utilizando una campana de flujo laminar, bajo las mayores condiciones posibles de esterilidad.

Durante todo el proceso se evitó la acción de la luz sobre los extractos acuosos, con el fin de evitar alguna disminución de su - posible acción fasciolicida.

2) Compuestos químicos:

Se probaron 11 compuestos de síntesis química los cuales se so lubilizaron en etanol, por haber sido el mejor solvente en las prue bas realizadas con este fin.

En una balanza analítica se pesaron 5 mg de cada compuesto, - colocándose en tubos de ensaye, a los cuales se agregó con una mi- cropipeta, 0.1 ml de etanol puro, tapándose inmediatamente para evi tar la evaporación. Se agitaron y se llevaron a 10 ml. Con agua destilada, agitando nuevamente en un vortex; siendo necesario soni car las sustancias que no fueron totalmente disueltas mediante el procedimiento anterior.

Cada sustancia se probó por cuadruplicado a concentraciones - de 50 y 100 μ g/ml, siguiendo el método descrito para el probado de los extractos vegetales.

ESCRUTINIO DE EXTRACTOS VEGETALES CONTRA FASCIOLAS ADULTAS

En virtud de que se busca una sustancia de acción fasciolici- da susceptible de ser empleada contra la duela del hígado en cual- quier estadio de su desarrollo ontogenético, se probaron sólo los

extractos acuosos de las plantas que mostraron actividad contra las duelas recién desenquistadas, ya que como se sabe, éstas son mucho más resistentes que las adultas; siendo más probable que una sustancia activa contra los estados juveniles lo sea también contra los adultos.

Las fasciolas adultas de 8 semanas de edad, se obtuvieron de ovinos criollos infestados artificialmente. Estas se recuperaron de los hígados con sumo cuidado, lavándolas y colocándolas en cajas petri con medio de cultivo y antibiótico durante dos horas y media, con el fin de desinfectarlas, manteniendo siempre la temperatura a 37°C.

Para estas pruebas se utilizaron cajas individuales para cultivo de tejidos de mayor volumen (50 ml), colocando 3 duelas por caja en un medio de igual composición que el empleado para las duelas recién desenquistadas sólo que en mayor proporción, dando un volumen final de 6 ml.

También se incubaron las cajas a 37°C con 5% de CO₂, haciendo las observaciones del efecto de los extractos a las 24 y 48 horas de la exposición a dichas sustancias.

Las pruebas se hicieron por cuadruplicado para las dos concentraciones probadas que fueron 5 y 2.5 mg de planta/ml, en todos los casos. Para cuatro de las plantas se probó una concentración

de 10 mg/ml y 2 diluciones de 1.25 y 0.62 mg/ml, también por cuadruplicado.

Evaluación de resultados.

Se evaluó la acción de los diferentes extractos vegetales y sustancias químicas probadas, en base a la motilidad que presentaron los parásitos de los lotes experimentales, en relación con los parásitos de los lotes testigo.

A continuación se describe el nombre científico, familia y nombre común de las plantas utilizadas para este estudio.

NOMBRE CIENTIFICO	FAMILIA	NOMBRE COMUN
<u>Aloe vera</u> L.	Lilia.	Zábila
<u>Allium cepa</u> L.	Lilia	Cebolla
<u>Allium sativum</u> L.	Lilia.	Ajo
<u>Ambrosia artemisiaefolia</u> L.	Compo.	Altamisa
<u>Apium graveolens</u> L.	Umbel.	Apio
<u>Ardisia compressa</u> H.B.K.	Mirci.	Capulín
<u>Artemisia mexicana</u> Willd.	Compo.	Estafiate
<u>Artemisia</u> sp.	Compo.	Estafiate
<u>Artemisia vulgaris</u> L.	Compo.	Ajenjo
<u>Bidens pilosa</u> L.	Compo.	Aceitilla
<u>Bixa orellana</u> L.	Bixac.	Achiote
<u>Brassica oleraceae</u> L.	Cruci.	Col
<u>Buddleia Scordioides</u>	Logan.	Escobilla de perro
<u>Caesalpinia pulcherrima</u> (L) Sw.	Legum.	Tabachin

NOMBRE CIENTIFICO	FAMILIA	NOMBRE COMUN
<u>Carica papaya</u> L.	Caric.	Papaya
<u>Cassia grandis</u> L.	Legum.	Caña fístula
<u>Castela tortuosa</u>	Simar.	Chaparro amargo
<u>Cecropia peltata</u> L.	Morac.	Guarumbo
<u>Cestrum nocturnum</u> L.	Solan.	Huele de noche
<u>Citrus limon</u> Burni	Rutac.	Limón
<u>Cocos nucifera</u> L.	Palma	Coco
<u>Coleosanthus squarrosus</u> (Cav) Blake	Compo.	Prodigiosa
<u>Comelina coelestis</u> willd.	Comme.	Madalia
<u>Croton draco</u> Sch.	Eufor.	Sangregado
<u>Cucurbita pepo</u> L.	Cucur.	Calabaza
<u>Cuphea aequipetala</u> Cav.	Lythr.	Alfilerillo
<u>Cuassia amara</u> L.	Simar.	Cuassia
<u>Cynara scolymus</u> L.	Compo	Alcachofa
<u>Chenopodium ambrosioides</u> L.	Cheno.	Epazote
<u>Chenopodium graveolens</u> Lag. Rguez	Cheno.	Epazote zorrillo
<u>Chenopodium macrostemum</u> Benth	Labia	Poléo
<u>Datura stramonium</u> L.	Solan.	Toloache
<u>Dryopteris filix-mas</u> (L.) Schott	Polip.	Helecho macho
<u>Equisetum laevigatum</u>	Equis.	Cola de caballo
<u>Erythraea tetramera</u> Schlt.	Genci	Tlanchalahua
<u>Erythrina americana</u> Mill	Legum	Colorín
<u>Eucaliptus globulus</u> Labill	Mirta	Eucalipto
<u>Euphorbia postrata</u> Ait.	Eufor.	Hierba de la golondrina
<u>Ficus carica</u> L.	Morac.	Higuera
<u>Heliotropium curassavicum</u> L.	Borra.	Cola de alacrán
<u>Jacobina spicigera</u> schelecht	Acant.	Muicle
<u>Jatropha dioica</u> (H.B.K.) Mc.Baugh	Eufor.	Sangre de drago
<u>Juliana adstringens</u> schl.	Julia	Cuachalalate
<u>Lippia citriodora</u> H.B.K.	Verbe	Cedrón

NOMBRE CIENTIFICO	FAMILIA	NOMBRE COMUN
<u>Malva parviflora</u> L.	Malva	Malva
<u>Mandevilla foliosa</u> (muell.Arg) Hemsl	Apocy	San Pedro
<u>Marrubium vulgare</u> Linn.	Labia	Marrubium
<u>Mentha canadensis</u> L.	Labia	Mentha
<u>Mentha spicata</u> L.	Labia	Herba buena
<u>Mimosa pigra</u> L.	Legum.	Zarza
<u>Momordica charantia</u> L.	Cucur.	Cundeamor
<u>Montanoa tomentosa</u> Cervant	Compo.	Zoapatli
<u>Nicotiana tabacum</u> L.	Solan.	Tabaco
<u>Ocimum basilicum</u> L.	Labia	Albahaca
<u>Oenothera rosea</u> Ait.	Onagr.	Arnica
<u>Persea americana</u> Miller	Laura	Aguacate
<u>Peumus boldo</u> Molina	Monim.	Boldo
<u>Piper amalago</u> L.	Piper.	Cordoncillo
<u>Piper sanctum</u> (Miq.)Schelechter	Piper.	Tlanepa
<u>Plantago major</u> L.	Plant.	Llantén
<u>Psidium guayava</u> L.	Myrta	Guayaba
<u>Ricinus communis</u> L.	Eufor.	Huiguerilla
<u>Rosa centifolia</u> L.	Rosac.	Rosa de Castilla
<u>Rumex crispus</u> L.	Polig.	Lengua de vaca
<u>Rumex obtusifolius</u> L.	Polig.	Lengua de vaca
<u>Ruta graveolens</u> L.	Rutac.	Ruda
<u>Sambucus mexicana</u> Presl.	Capri	Sauco
<u>Schinus molle</u> L.	Anaca.	Pirul
<u>Sechium edule</u> Sw.	Cucur.	Chayote
<u>Sida rhombifolia</u> L.	Malva	Escobilla
<u>Sium erectum</u> Huds	Umbel.	Berro
<u>Solanum verbascifolium</u>	Solan	Uña de gato
<u>Stachytarpheta jamaicensis</u> Vahl.	Verbe.	Verbena
<u>Tabernaemontana grandiflora</u> Jacq.	Apoci	Lecherillo

NOMBRE CIENTIFICO	FAMILIA	NOMBRE COMUN
<u>Tagetes lucida</u> H.B.K.	Compo	Hierba anís
<u>Tagetes tenuifolia</u> Cav.	Compo	Flor de muerto
<u>Tagetes trirradiata</u> Greenn.	Compo	Flor de muerto
<u>Thimus vulgaris</u> L.	Labia.	Tomillo
<u>Zaluzania triloba</u> (ort.) Pers.	Compo	Hediodilla
<u>Zebrina pendula</u> Schinz	Comme.	Hierba del pollo

* Se probaron 14 plantas más, las cuales no fue posible identificar por carecer de flor

RESULTADOS

a) Extractos vegetales

Sólo 9 de los 95 extractos vegetales probados contra duelas recién desenquistadas fueron de acción letal para los parásitos, a las concentraciones de 5 mg/planta/ml y 2.5 mg/planta/ml. En ninguno de los casos tuvieron efecto las diluciones de 1.25 y 0.62 mg/planta/ml que se probaron posteriormente, como puede verse en los cuadros 1 y 2.

Debido a los problemas técnicos que se presentaron en el manejo de las duelas adultas, no fue posible obtener resultados confiables aún cuando las pruebas se repitieron varias veces. Sin embargo existen razones para creer que al menos algunas de estas plantas puedan tener acción contra los estadios maduros del parásito.

b) Productos químicos

Los productos químicos evaluados también en parásitos recién desenquistados, no mostraron potencial fasciolicida, ya que con excepción de cuatro de ellos que a concentración de 50 ~~µg~~ µg/ml causaron la mortalidad del 100% de los parásitos, los demás a esa misma concentración, y todos a la concentración de 10 ~~µg~~ µg/ml no mostraron ningún efecto sobre los mencionados parásitos.

CUADRO No. 1

RESULTADO DEL PRUBADO DE DIVERSOS EXTRACTOS VEGETALES EN FASCIOLAS
RECIENTE DESENUISTADAS

PLANTA	PARTES EMPLEADAS	CONCENTRACION* (mg planta/ml)	ACTIVIDAD EXTRACTO
No. 1 <u>Chenopodium graveolens</u> (fresco)	1,3,4,6	5.0 2.5	+ +
No. 1 <u>Chenopodium graveolens</u> (seco)	1,3,4,6	5.0 2.5	- -
No. 2 <u>Artemisia</u> sp. (fresco)	1,3,4	5.0 2.5	+ +
No. 2 <u>Artemisia</u> sp. (seco)	1,3,4	5.0 2.5	+ +
No. 3 <u>Buddleia scordioides</u>	1,3,4	5.0 2.5	- -
No. 4 <u>Rumex crispus</u>	1,3	5.0 2.5	- -
No. 5 <u>Montanoa tomentosa</u>	3	5.0 2.5	- -
No. 6 <u>Cynara scolymus</u> (fresco)	1,3	5.0 2.5	+ +
No. 6 <u>Cynara scolymus</u> (seco)	1,3	5.0 2.5	+ +
No. 7 <u>Dryopteris filix-mas</u>	2	5.0 2.5	- -

La clave empleada para designar las partes de la planta fue la siguiente:

1 = hoja	4 = flor	9 = toda la planta
2 = raíz	5 = fruto	10 = corteza
3 = tallo	6 = semilla	

* Cada concentración se probó por duplicado.

PLANTA		PARTES EMPLEADAS	CONCENTRACION* (mg planta/ml)	ACTIVIDAD EXTRACTO
No. 8				
<u>Bidens pilosa</u>	(fresco)	1,3,4	5.0 2.5	- -
No. 8				
<u>Bidens pilosa</u>	(seco)	1,3,4	5.0 2.5	- -
No. 9				
<u>Equisetum laevigatum</u>		3	5.0 2.5	- -
No. 10				
<u>Artemisia mexicana</u>	(fresco)	1,3,4	5.0 2.5	+ +
No. 10				
<u>Artemisia mexicana</u>	(seco)	1,3,4	5.0 2.5	+ +
No. 11				
<u>Marrubium vulgare</u>	(fresco)	1,3,4	5.0 2.5	- -
No. 11				
<u>Marrubium vulgare</u>	(seco)	1,3,4	5.0 2.5	- -
No. 12				
<u>Artemisia vulgaris</u>		1,3	5.0 2.5	- -
No. 13				
<u>Ocimum vasilicum</u>	(fresco)	1,3	5.0 2.5	- -
No. 13				
<u>Ocimum vasilicum</u>	(seco)	1,3	5.0 2.5	- -
No. 14				
<u>Castela tortuosa</u>		1,3,10	5.0 2.5	- -
No. 15				
<u>Aloe vera</u>	(fresco)	9	5.0 2.5	- -
No. 16				
<u>Ruta graveolens</u>	(fresco)	1,3,6	5.0 2.5	- -
No. 16				
<u>Ruta graveolens</u>	(seco)	1,3,6	5.0 2.5	- -
No. 17				
<u>Mentha spicata</u>		1,3	5.0 2.5	- -

PLANTA	PARTES EMPLEADAS	CONCENTRACION (mg planta/ml)	ACTIVIDAD EXTRACTO
No. 18			
<u>Allium sativum</u>	3	5.0	-
		2.5	-
No. 19			
<u>Erythrina americana</u> (fresco)	6	5.0	-
		2.5	-
No. 19			
<u>Erythrina americana</u> (seco)	6	5.0	-
		2.5	-
No. 20			
<u>Heliotropium curassavicum</u>	1,2,3,4	5.0	-
		2.5	-
No. 21			
no identificada	1,2,3	5.0	-
		2.5	-
No. 22			
<u>Rumex obtusifolius</u>	1,3	5.0	-
		2.5	-
No. 23			
<u>Cassia grandis</u>	1,3,4,6	5.0	-
		2.5	-
No. 24			
<u>Comelina coelestis</u> (fresco)	1,3,4	5.0	-
		2.5	-
No. 24			
<u>Comelina coelestis</u> (seco)	1,3,4	5.0	-
		2.5	-
No. 25			
<u>Sium erectum</u>	1,3	5.0	-
		2.5	-
No. 26			
<u>Momordica charantia</u>	1,3	5.0	-
		2.5	-
No. 27			
No identificada	1,3	5.0	-
		2.5	-
No. 28			
<u>Tabernaemontana grandiflora</u>	1,3	5.0	-
		2.5	-
No. 29			
no identificada	1,3	5.0	-
		2.5	-
No. 30			
<u>Mandevilla foliosa</u>	1,3,4	5.0	-
		2.5	-

PLANTA	PARTES EMPLEADAS	CONCENTRACION (mg planta/ml)	ACTIVIDAD EXTRACTO
No. 31 <u>Carica papaya</u>	1,3,4,6	5.0 2.5	- -
No. 32 <u>Sechium edule</u>	1,3	5.0 2.5	- -
No. 33 <u>Sida rhombifolia</u>	1,2,3,4	5.0 2.5	- -
No. 34 <u>Piper sanctum</u> (fresco)	1,2,3	5.0 2.5	- -
No. 34 <u>Piper sanctum</u> (seco)	1,2,3	5.0 2.5	- -
No. 35 <u>Solanum verbascifolium</u>	1,3,5	5.0 2.5	- -
No. 36 <u>Mimosa pigra</u>	1,3	5.0 2.5	- -
No. 37 no identificada	1,3	5.0 2.5	- -
No. 38 <u>Piper amalago</u>	1,3	5.0 2.5	- -
No. 39 <u>Tagetes lucida</u> (fresco)	1,2,3,4	5.0 2.5	- -
No. 39 <u>Tagetes lucida</u> (seco)	1,2,3,4	5.0 2.5	- -
No. 40 <u>Cecropia peltata</u>	1,3	5.0 2.5	- -
No. 41 no identificada	1,3	5.0 2.5	- -
No. 42 <u>Bixa orellana</u>	1,3,6	5.0 2.5	- -
No. 43 no identificada	1,3	5.0 2.5	- -

PLANTA	PARTES EMPLEADAS	CONCENTRACION (mg planta/ml)	ACTIVIDAD EXTRACTO
No. 44 <u>Croton draco</u>	1,3	5.0 2.5	- -
No. 45 <u>Ardisia compressa</u>	1,3,5	5.0 2.5	- -
No. 46 <u>Cestrum nocturnum</u>	1,3	5.0 2.5	- -
No. 47 <u>Zebrina pendula</u> (fresco)	1,3	5.0 2.5	- -
No. 47 <u>Zebrina pendula</u> (seco)	1,3	5.0 2.5	- -
No. 48 <u>Stachytarpheta jamaicensis</u>	1,2,3,4	5.0 2.5	+ +
No. 49 no identificada	1,3	5.0 2.5	- -
No. 50 no identificada	1,3	5.0 2.5	- -
No. 51 <u>Allium cepa</u> (fresco)	3	5.0 2.5	- -
No. 52 <u>Lippia citriodora</u>	1,3,4	5.0 2.5	- -
No. 53 <u>Psidium guajava</u> (fresco)	1,3	5.0 2.5	- -
No. 53 <u>Psidium guajava</u> (seco)	1,3	5.0 2.5	- -
No. 54 <u>Oenothera rosea</u>	1,3	5.0 2.5	- -
No. 55 <u>Jacobinia spicigera</u>	1,3,4	5.0 2.5	- -
No. 56 <u>Brassica oleraceae</u> (fresco)	1	5.0 2.5	- -

PLANTA	PARTES EMPLEADAS	CONCENTRACION (mg planta/ml)	ACTIVIDAD EXTRACTO
No. 57			
<u>Rosa centifolia</u>	4	5.0 2.5	- -
No. 58			
<u>Erythraea tetramera</u>	3	5.0 2.5	- -
No. 59			
<u>Cuassia amara</u>	3	5.0 2.5	- -
No. 60			
<u>Juliania adstringens</u>	3	5.0 2.5	- -
No. 61			
<u>Sambucus mexicana</u>	4	5.0 2.5	- -
No. 62			
<u>Mentha canadensis</u>	1,3	5.0 2.5	- -
No. 63			
<u>Chinopodium macrostemum</u>	1,3,4	5.0 2.5	- -
No. 64			
<u>Coleosanthus squarrosus</u>	1,3,4	5.0 2.5	- -
No. 65			
<u>Peumus boldo</u>	1	5.0 2.5	+ +
No. 66			
<u>Mentha rotundifolia</u>	1,3	5.0 2.5	- -
No. 67			
no identificada	1,3	5.0 2.5	- -
No. 68			
<u>Jatropha dioica</u> (fresco)	2	5.0 2.5	- -
No. 68			
<u>Jatropha dioica</u> (seco)	2	5.0 2.5	- -
No. 69			
<u>Eucaliptus globulus</u> (fresco)	1,4,5	5.0 2.5	+ +
No. 69			
<u>Eucaliptus globulus</u> (seco)	1,4,5	5.0 2.5	+ +

PLANTA	PARTES EMPLEADAS	CONCENTRACION (mg planta/ml)	ACTIVIDAD EXTRACTO
No. 70 <u>Plantago major</u>	(fresco) 1,2,3	5.0 2.5	- -
No. 70 <u>Plantago major</u>	(seco) 1,2,3	5.0 2.5	- -
No. 71 <u>Apium graveolens</u>	(fresco) 1,3	5.0 2.5	- -
No. 72 <u>Euphorbia postrata</u>	(fresco) 9	5.0 2.5	- -
No. 72 <u>Euphorbia postrata</u>	(fresco) 9	5.0 2.5	- -
No. 73 <u>Cucurbita pepo</u>	6	5.0 2.5	- -
No. 74 <u>Chenopodium ambrosioides</u>	1,3,6	5.0 2.5	- -
No. 75 <u>Tagetes trirradiata</u>	1,2,3,4	5.0 2.5	- -
No. 76 <u>Datura stramonium</u>	(fresco) 6	5.0 2.5	- -
No. 76 <u>Datura stramonium</u>	(seco) 6	5.0 2.5	- -
No. 77 <u>Ficus carica</u>	1,3	5.0 2.5	- -
No. 78 <u>Citrus limon</u>	6	5.0 2.5	- -
No. 79 <u>Ricinus communis</u>	(fresco) 6	5.0 2.5	- -
No. 80 <u>Persea americana</u>	6	5.0 2.5	- -
No. 81 <u>Cuphea aequipetala</u>	1,3,4	5.0 2.5	- -

PLANTA	PARTES EMPLEAD.	CONCENTRACION (mg planta/ml)	ACTIVIDAD EXTRACTO
No. 82			
no identificada	1,3	5.0	-
		2.5	-
No. 83			
no identificada	1,3	5.0	-
		2.5	-
No. 84			
No identificada	1,3	5.0	-
		2.5	-
No. 85			
<u>Ambrosia artemisiaefolia</u> (fresco)	1,3,4	5.0	+
		2.5	+
No. 85			
<u>Ambrosia artemisiaefolia</u> (seco)	1,3,4	5.0	+
		2.5	+
No. 86			
no identificada	1,3	5.0	-
		2.5	-
No. 87			
no identificada	10	5.0	-
		2.5	-
No. 88			
<u>Cocos nucifera</u> (fresco)	7	5.0	-
		2.5	-
No. 89			
<u>Tagetes tenuifolia</u> (fresco)	1,2,3,4	5.0	-
		2.5	-
No. 89			
<u>Tagetes tenuifolia</u> (seco)	1,2,3,4	5.0	-
		2.5	-
No. 90			
<u>Schinus molle</u>	1,3,4,5	5.0	-
		2.5	-
No. 91			
<u>Caesalpinia pulcherrima</u>	1,3,4	5.0	-
		2.5	-
No. 92			
<u>Malva parviflora</u>	1,2,3,5	5.0	-
		2.5	-
No. 93			
<u>Thimus vulgaris</u>	1,2,3	5.0	-
		2.5	-
No. 94			
<u>Nicotiana tabacum</u> (fresco)	1	5.0	-
		2.5	-

PLANTA		PARTES EMPLEADAS	CONCENTRACION (mg planta/ml)	ACTIVIDAD EXTRACTO
No. 94				
<u>Nicotiana tabacum</u>	(seco)	1	5.0	-
			2.5	-
No. 95				
<u>Zaluzania triloba</u>	(fresco)	1,2,3,4	5.0	+
			2.5	+
No. 95				
<u>Zaluzania triloba</u>	(seco)	1,2,3,4	5.0	+
			2.5	+

CUADRO No. 2

ACTIVIDAD in vitro DE DIVERSOS EXTRACTOS DE PLANTAS CONTRA FASCIOLOS RECIENTE DESEQUISTADAS

<u>P L A N T A</u>	<u>FAMILIA</u>	CONCENTRACION* (mg planta/ml.)		
		5.0	2.5	1.25
<u>Ambrosia artemisiaefolia</u> L.	Compo	+	+	-
<u>Artemisia mexicana</u> Willd.	Compo	+	+	-
<u>Artemisia</u> sp	Compo	+	+	-
<u>Cynara scolymus</u> L.	Compo	+	+	-
<u>Chenopodium graveolens</u> Lag.	Compo	+	+	-
<u>Eucalyptus globulus</u> Labill	Mirta	+	+	-
<u>Peumus boldus</u> Molina.	Monim	+	+	-
<u>Stachytarpheta jamaicensis</u> Vahl.	Verbe.	+	+	-
<u>Zaluzania triloba</u> (Ort.) Pers.	Compo	+	+	-

* Cada concentración se probó por cuadruplicado

CUADRO No. 3

ACTIVIDAD in vitro DE COMPUESTOS QUIMICOS CONTRA FASCIOLAS RECIENTE
DESENGUASTADAS

CLAVE DEL COMPUESTO	CONCENTRACION (ug/ml)	ACTIVIDAD DEL COMPUESTO
IH - 1	50	-
	50	-
	50	-
	50	-
	10	-
	10	-
	10	-
	10	-
IH - 2	50	-
	50	-
	50	-
	50	-
	10	-
	10	-
	10	-
IH - 3	50	+
	50	+
	50	+
	50	+
	10	-
	10	-
	10	-
IH - 4	50	+
	50	+
	50	+
	50	+
	10	-
	10	-
	10	-

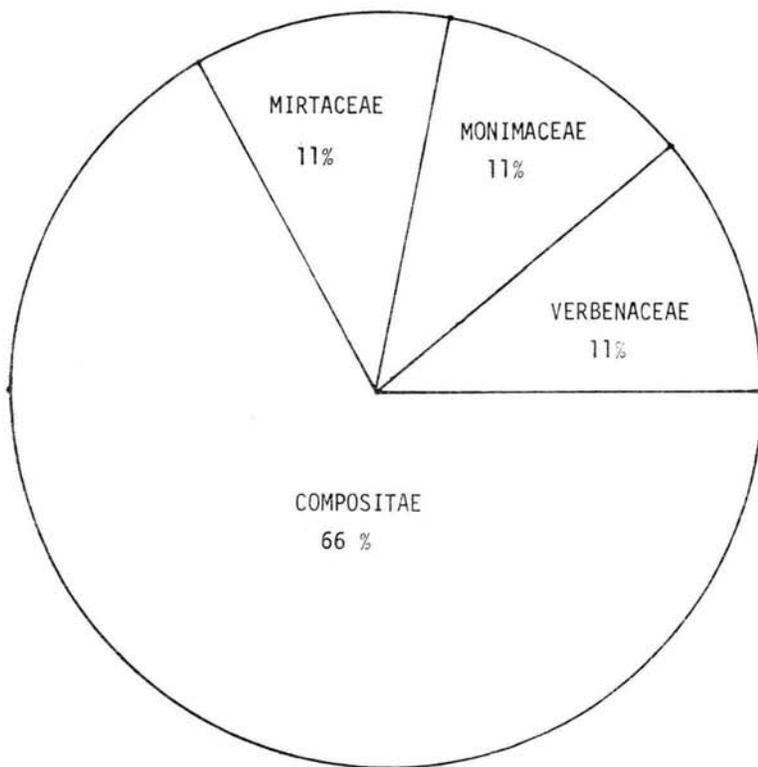
CLAVE DEL COMPUESTO	CONCENTRACION (ug/ml)	ACTIVIDAD DEL COMPUESTO
IH - 5	50	+
	50	+
	50	+
	50	+
	10	-
	10	-
	10	-
LN - 1	50	-
	50	-
	50	-
	50	-
	10	-
	10	-
	10	-
LN - 5	50	-
	50	-
	50	-
	50	-
	10	-
	10	-
	10	-
LN - 10	50	-
	50	-
	50	-
	50	-
	10	-
	10	-
	10	-

CLAVE DEL COMPUESTO	CONCENTRACION (ug/ml)	ACTIVIDAD DEL COMPUESTO
IRC/FBV	50	-
	50	-
	50	-
	50	-
	10	-
	10	-
	10	-
MTR-I	50	+
	50	+
	50	+
	50	+
	10	-
	10	-
	10	-
MTR-2	50	-
	50	-
	50	-
	50	-
	10	-
	10	-
	10	-

NOTA: Las claves empleadas para designar los compuestos no son comerciales; por ética profesional no se dan los nombres o fórmulas moleculares de dichos compuestos. Si se desea mayor información pueden dirigirse al Proyecto Fasciolosis del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias de la S.A.R.H.

FIGURA I

IMPORTANCIA DE FAMILIAS DE PLANTAS PROBADAS CON POSIBLE POTENCIAL FASCIOLICIDA



DISCUSION

De los resultados obtenidos con los extractos de plantas se pueden observar algunas cosas interesantes, como el hecho de que un 66% de los extractos vegetales que mostraron actividad contra la duela del hígado pertenezcan a la familia Compositae, (Cuadro 1, Fig. 1); esto es un buen indicio de que la actividad de las plantas no se debió meramente al azar, pues perteneciendo a la misma familia es muy probable que presenten también algunas sustancias en común, y que sean las responsables de su actividad -- contra el parásito. Naturalmente habría que comprobarlo realizando extracción química para la identificación de los principios activos de dichas plantas.

Con excepción de Eucalyptus globulus, todas las plantas que tuvieron acción contra los parásitos (cuadros 1 y 2) son empleadas popularmente como antihelmínticos; esto apoya también lo dicho anteriormente en el sentido de que es posible que realmente existan en estas plantas, sustancias con potencial fasciolicida, siendo poco probable que su actividad se haya debido al empleo de una alta concentración ya que las plantas de reconocida y variable toxicidad (Aguilar y Zolla, 1982) que se utilizaron en este estudio, como son Datura stramonio (Toloache), Caesalpinia pulcherrima (Tabachin), Erythrina americana (colorín), Ricinus comu-

nis (higuerilla), entre otros; probados a las mismas concentraciones, no tuvieron el menor efecto sobre las duelas recién desenquistadas, quedando por otra parte confirmada la gran resistencia que poseen estos parásitos, lo cual ya había sido demostrado por algunos investigadores entre los que cabe destacar a Ibarra (1984) quien probó varias sustancias de conocido efecto fasciolicida contra fasciolas juveniles y adultas, encontrando que en su mayoría no tienen ningún efecto en fasciolas recién desenquistadas, lo mismo que otros antihelmínticos y antiprotozoarios conocidos. Por este motivo, el hecho de que el 10% de los extractos vegetales manejados aquí hayan resultado letales para las duelas recién desenquistadas se considera alentador y manifiesta la importancia que tiene el estudio de nuestra flora medicinal con estos fines.

Como se puede observar en el Cuadro No. 1 las plantas presentaron la misma actividad tanto en fresco como en seco, siendo la excepción Chenopodium graveolens la cual se colectó en el campo - totalmente seca, aunque conservaba su penetrante aroma. En este caso el extracto de la planta fresca causó la mortalidad del 100% de los parásitos mientras que el extracto de la planta seca no tuvo ningún efecto sobre ellos (la prueba se repitió cuatro veces - para verificar los resultados).

Es necesario señalar que en todos los casos la actividad de las plantas se localizó en la parte aérea de las mismas, al igual

que lo encontrado por Susplugas et al. (1980) y N'Dounga et al. (1984) quienes trabajaron con Inula viscosa y Bidens pilosa respectivamente, realizando extracción química de sus compuestos para probarlos contra algunos parásitos de distintas especies.

Los mencionados autores encontraron que los extractos acuosos de esas plantas fueron inactivos, presentando diferente grado de actividad los extractos obtenidos con distintos solventes. Considerando esto, y teniendo en cuenta que muchas sustancias no son solubles en agua, el hecho de que en este estudio se haya detectado actividad en los extractos acuosos de varias plantas, permite esperar una mayor actividad de las sustancias de esas mismas plantas, empleando otros solventes para su extracción; además de un mayor número de plantas con potencial fasciolicida entre las que tienen propiedades antihelmínticas, que no se detectaron mediante el sistema de extracción acuosa, como ocurrió en este caso con Bidens pilosa. (Cuadro No. 1) a la que N'Dounga et al. (1984) reportan con acción fasciolicida y a la que con este sistema se encontró sin efecto alguno. Curiosamente a B. pilosa se le da un amplio uso en nuestro país contra muy diversas afecciones, pero no se emplea como antihelmíntico, la razón es que, como a la mayoría de las plantas, se le usa en forma de cocción y como se sabe ahora el principio activo que afecta a los helmintos no es hidrófilo.

Otras de las causas que pudieron influir para que no se de-

tectara actividad antihelmíntica en el 90% de las plantas probadas, es que los principios activos hayan sido volátiles, termolábiles o no solubles en agua, descartándose el que fueran fotosensibles, que de hecho, en su mayoría lo son (El Hadi et al, 1984; Gallardo 1983), ya que este parámetro se tuvo bajo control.

Los extractos de las plantas que resultaron positivos, se probaron a diluciones menores manteniendo su actividad todos ellos al 50% de la concentración original, como se aprecia en el Cuadro No. 2; lo cual indica que se trata de plantas con una potencia similar y explica el que la mayoría de ellas se empleen popularmente con éxito como antihelmínticos.

Respecto al modo de acción de los extractos de las 9 plantas que resultaron positivas, aún cuando todos ellos causaron la mortalidad del 100% de los parásitos recién desenquistados, se pudo apreciar que tuvieron un efecto diferente, observándose básicamente 2 patrones en el modo de acción; análogos a los encontrados por Fairweather (1984) al valorar in vitro los efectos de fasciolidas conocidos sobre la motilidad de los parásitos, estos son:

1) incremento en el tono muscular, con parálisis final en estado contraído.

2) depresión de la actividad con parálisis en condición relajada, sin cambio observable en el tono muscular.

En el segundo caso se observó a las fasciolas relajadas, aunque con algunos extractos la desintegración de los órganos internos era notoria y con otros, los órganos internos se mantenían intactos siendo la desintegración del cuerpo la más evidente; no quedando duda de que la muerte de los parásitos había sido causada por los mencionados extractos. El mismo autor señala también un tercer efecto consistente en la estimulación de la actividad sin cambio en el tono muscular y Rew et al. (1983) observaron que, dependiendo del tiempo de exposición y de la dosis de fasciolicida empleada, hay una parálisis irreversible que involucra un incremento en la tensión muscular y un decremento en la amplitud de la contracción.

Estos efectos se pudieron apreciar en las duelas maduras, por lo que se piensa que tal vez algunos de los extractos utilizados hayan tenido acción contra ellas, aunque no es posible asegurarlo, debido a las dificultades que se presentaron para mantener in vitro a las duelas adultas por más de 24 horas y poder valorar adecuadamente el efecto de dichos extractos, en virtud de que, aparte de ser más sensibles que las duelas juveniles, alteran rápidamente el medio con los productos de su metabolismo.

Sin embargo es factible que éstas y otras plantas sean efectivas contra el parásito adulto, pues se tienen noticias de que en Puebla se emplea con éxito el "chaparro amargo" para desparasitar ovejas, así como la raíz de jacaranda con zábila en otros lugares.

Por otra parte el Dr. Froylán Ibarra, asesor de esta tesis, a través de comunicación personal con gente de la zona en que trabaja (Puebla), encontró que hay un alto índice de fascioliasis en humanos, y que la combaten aparentemente con buenos resultados, con un té comercial preparado a base de Chenopodium ambrosioides, Castela tortuosa y Swietenia macrophylla en diferentes proporciones.

Desafortunadamente no fue posible comprobar la efectividad de estas plantas en el sistema in vitro utilizado, por las razones expuestas anteriormente.

Por lo que respecta a los productos químicos, se considera que ninguno de ellos tuvo acción fasciolicida, ya que la concentración de 50 g/ml a la que fueron activos cuatro de ellos (Cuadro No. 3) es muy elevada, aparte de ser sustancias puras, por lo que resultan tóxicas para cualquier ser vivo.

Es conveniente recalcar que en este estudio se consideró con posible potencial fasciolicida sólo las sustancias tanto de extractos vegetales como de síntesis química que fueron de acción letal para los parásitos, no siendo posible detectar mediante este sistema, la acción de sustancias que sin llegar a causar la muerte de las duelas, las afecten de tal modo que faciliten su eliminación del hospedero. Por otra parte, es necesario tener presente, como ya se mencionó, que algunas sustancias activas de las plantas son

volátiles, termolábiles o no solubles en agua; por lo que seguramente varias de ellas también pasaron inadvertidas, lo mismo que - aquellas que necesitan ser metabolizadas para tornarse activas, como es el caso de algunos fasciolicidas conocidos.

Pese a las limitaciones de este estudio se obtuvieron resultados importantes, al ponerse de manifiesto que existen sustancias - naturales de origen vegetal con potencial fasciolicida; a la vez que se delineó una metodología económica, rápida y confiable para la búsqueda preliminar de sustancias naturales susceptibles de ser empleadas en contra de Fasciola hepatica en sus estadios más resis- tentes, estableciéndose de este modo las bases para futuras inves- tigaciones en este campo.

CONCLUSIONES

a) Por los resultados obtenidos se concluye que existen en nuestro país un número considerablemente significativo de plantas, entre las que se usan popularmente con fines antihelmínticos; cuyas sustancias naturales son susceptibles de ser empleadas como fasciolicidas. Siendo necesario realizar estudios más detallados de cada una de las plantas que resultaron activas en este trabajo; realizando extracción química para la identificación del ó de los principios activos de dichas plantas.

A la vez que se manifiesta muy importante continuar probando de manera preliminar varios cientos de extractos de plantas y productos de síntesis química con el fin de llegar a producir un fasciolicida en México.

b) Bajo las condiciones en que se desarrolló el presente estudio, se encontró que la técnica de prueba in vitro de compuestos - en contra de fasciolas recién desenquistadas es satisfactoria, y efectiva para detectar actividad antihelmíntica. Siendo necesario realizar algunas modificaciones para poder utilizarla con el mismo éxito en el caso de fasciolas adultas.

Aunque no se contó con pruebas bioquímicas que ayudaran a co

roborar la efectividad de los extractos vegetales que resultaron positivos en este estudio, se comprobó que con el método de extracción acuosa, se reducen costos y se ahorra tiempo al permitir seleccionar de entre una gran cantidad de plantas con propiedades antihelmínticas, a aquellas que presenten además un posible potencial fasciolicida; lo cual acelera enormemente la investigación, - ya que se cuenta también con la técnica adecuada para realizar in vitro, la prueba simultánea de varias sustancias.

APENDICE I

Desenquistamiento de metacercarias

Se coloca el número de quistes necesarios en un frasco con tapón de rosca, de aproximadamente 20 ml que previamente contenga el medio de activación; el cual se prepara de la siguiente manera: Se burbujea CO₂ puro durante 5 minutos a través de 10 ml de agua destilada fría, con ayuda de una pipeta pasteur, cerrando de inmediato herméticamente e incubando a 37°C durante 1 1/2 h. Después de la incubación, por sedimentación, se lavan los quistes 2 veces, en aproximadamente 20 ml de agua destilada precalentada; se extrae el exceso de agua dejando aproximadamente 2 ml y se añaden 5 ml del medio de emergencia precalentado, incubándose nuevamente durante 2 1/2 h a 37°C.

El medio de emergencia contiene 6% v/v de bilis de bovino o conejo, la cual se obtiene en forma aséptica, por aspiración de vesículas recientemente removidas; y 94% v/v de solución salina de Hanks con pH de 7.4.

Después de 2 1/2 h la mayoría de las metacercarias han desenquistado, entonces se extrae el sobrenadante para poder transferir las duelas a cajas petri con medio de cultivo precalentado, el cual contiene también antibiótico; donde permanecerán durante 2 h a 37°C, a fin de limpiarlas de organismos contaminantes. Después de esta última incubación están listas para ser utilizadas en las pruebas.

APENDICE II

Debido a que no se contó con todos los elementos necesarios - para la prueba in vitro de los compuestos químicos y extractos vegetales, fue necesario como ya se mencionó anteriormente, realizar varios ensayos, intentando encontrar la mejor forma de trabajar -- con los recursos de que se disponía en ese momento. Algunos de -- esos ensayos resultaron infructuosos, pero se mencionan dos de ellos para dejar el antecedente que puede ser de utilidad para quienes - se interesen por esta línea de investigación.

En la técnica original el medio de activación lleva 40 mg de Ditionito de sodio, mismo que se trató de sustituir por Ditionato de sodio, el cual redujo bastante el porcentaje de desenquistamiento a la concentración indicada. Al probar concentraciones menores se vio que el porcentaje de desenquistamiento era inversamente proporcional a la concentración de Ditionato utilizada; y con 10 mg - el % de desenquistamiento fue similar al obtenido sin Ditionato, y casi en el mismo tiempo, reduciéndose únicamente en 15 minutos el tiempo de incubación para el medio de activación, por lo que se - prescindió de dicha sustancia al no resultar funcional.

BIBLIOGRAFIA

- Abreu, R. y Rodríguez, D. (1982). In vitro embryogénesis of *Fasciola hepatica*. Rev. Salud Animal. 4(3): 49-56.
- Adachi, J. (1980). Experimental studies on antihelminthic effect of drugs 2. Antihelminthic effect against the larval parasite of different development stages. Bull. Azabu Univ. Vet. Med. 1(1): 131-144.
- Aguilar, C.A. y Zolla, C. (1982). Plantas tóxicas de México. Div. de Inf. Etnobotánica, Unidad de Investigación Biomédica en Medicina tradicional y Herbolaria del Instituto Mexicano del Seguro Social. México 271 p.
- Alcaino, A., Baker, N.F. y Fisk, R.A. (1976). Enzyme polymorphism in Fasciola hepatica L.: Esterases. Am. J. Vet. Res. 37(11): 1153 - 1157.
- Amo, R.S. (1979). Plantas medicinales del Estado de Veracruz, INIREB. Jalapa, Veracruz, México.
- Anderson, P.H., Berrets, S., Brush, P.J., Hebert, C.N., Parfitt, J.W., Patterson, D.S.P. (1977). Biochemical indicators of liver injury in calves with experimental fasciolosis Vet. Rec. 100: 43-45.
- Anderson, P.H., Berret, S., Patterson, D.S.P., (1978). Resistance to Fasciola hepatica in cattle. J. Comp. Path. 88: 245-251.
- Barnes, D.R. (1977). Zoología de los Invertebrados. 3a. Ed. Nueva Editorial Interamericana, México 826 p.
- Bennett, C.E., Wilson, R.A. Denison, J. (1972). An investigation of - the molecular characteristics important in simulation of an attachment response by the miracidium of Fasciola hepatica. Biochem. Physiol. 41: 129-137.
- Black, N.M. y Froyd, G. (1972). The possible influence of liver fluke infestation on milk quality. The Vet. Record 90(3):71-72.

- Bompard, P. (1949). Los grandes remedios vegetales. Editorial Divulgación. México, 135 p.
- Bonilla, C.A.V. (1974). Contribución al estudio de la Fasciola spp., - su frecuencia en ganado bovino de Tuxpan, Veracruz, Tesis profesional Fac. Med. Vet. y Zoot. UNAM. México.
- Boray, J.C.
 Studies on the suitability of the albino rat for testing anthelmintic activity against Fasciola hepatica. Ann. Trop. Méd. Parasit. 61: 104-111.
- Boray, J.C., M.D.V. y Roseby, F.B. (1969). The effect of the route of administration on the efficiency of clioxanide against immature-Fasciola hepatica. in sheep. Aust. Vet. J. 45: 363-365.
- Bove, W. (1977). El médico del hogar, tratado popular de plantas medicinales. Editora y Distribuidora Mexicana, México 183 p.
- Burden, D.J., Hammet, N.C. (1978). Microplate enzyme linked immunosorbent assay for antibody to Fasciola hepatica in cattle. Vet. Rec. 103-158.
- Cawdery, M.J.H., y Conway, A. (1971). Production effects of the liver fluke, Fasciola hepatica on beef cattle. Vet. Rec. 98(24)
- Cawdery, J.J. H., Strickland, K.L., Conway, A., y Crow, P.S. (1977). Production effects of liver fluke in cattle. I. the effects of infection on liver weight gain, feed intake, and food conversion efficiency in beef cattle. Br. Vet. J. 133(2).
- Cawdery, M.J.H. (1976). The effects of fascioliasis on ewe fertility. Br. Vet. J. 132(6): 568-575.
- Ciprian, C.N. (1977). Incidencia de nemátodos gastroentéricos y Fasciola hepatica en bocinos pertenecientes al Centro Campesino de Servicios de Celaya. Tesis profesional. Fac. Med. Vet. y Zoot. UNAM. México.
- Clegg, J.A. y Morgan, J. (1966). The lipid composition of the lipoprotein membranes on the egg-shell of Fasciola hepatica. Comp. Biochem. Physiol. 18: 573-578.

- Colegrave, A.J. (1968). Fascioliasis: Field trials of Nitroxylnil in sheep- Vet. Rec. 82: 343-348.
- Coles, G.C. (1975). Activity of comercial fasciolicides in small laboratory mamals. The Journal of Parasitology 61(1): 54-58.
- Coles, G.C. (1976). The inactivity of diamphenethide against liver fluke in certain species of mammals. Res. Vet. Sci. 20:110-111.
- Chávez, A. M.T. (1976). Etnobotánica mexicana, plantas popularmente empleadas en el estado de Morelos para el tratamiento de enfermedades del aparato digestivo. Tesis profesional. Fac. de Ciencias. UNAM. México.
- Dávalos, N.E. (1974). Estudio comparativo de cinco fasciolicidas en bovinos bajo condiciones de campo. Tesis profesional. Fac. de Med. Vet. y Zoot. U.N.A.M. México.
- Dickerson, G., Hareenist, M. y Kingsbury, P.A. (1971). A chemotherapeutic agent for all stages of liver fluke disease in sheep. Br. Vet. J. 127-129.
- Dimitrov, G. y Kantschev, L. (1970). Curación de la parasitación por distoma hepático con Bilevon-M. Noticias Médico Veterinarias, 70: 13-16.
- Dixon, K.E. (1966). The Physiology of excystment of the metacercariae of Fasciola hepatica L. Parasitology 56: 431-456.
- Dow, C., Ross, J.G. y Todd, J.R. (1967). The pathology of experimental fascioliasis in calves. J. Comp. Path. 77: 377-384.
- Doy, T.G., Hyghes, D.L. y Harness, E. (1981). Hypersensitivity in rats infected with Fasciola hepatica: Lack of correlation between serum reaginic antibody levels and rejection of flukes. Res. Vet. Sci. 30: 357-359.
- Duchateau, B.A. (1974). Contribución al conocimiento de incidencia de Fasciola hepatica en ganado bovino en el municipio de Martínez de la Torre, Ver. Tesis profesional. Fac. Med. Vet. Zoot. UNAM. México.

- El Hadi, M.A., Ahmed, K.B. y Yahia, M.E.K. (1984). Investigations of molluscicidal activity of certain sudanese plants used in folk - medicine. Part. IV. *Planta Médica* 1: 74-77.
- Fairweather, I.; Homes, S.A. y Threadgold, L.T. (1984). *Fasciola hepatica*: Mortality response to fasciolicides in vitro. *Exp. Parasitol.* 57(3): 209-224.
- Font Over, P. (1953). *Diccionario Botánico*. Editorial Labor. Barcelona.
- Font Over, P. (1980). *Plantas medicinales, el Dioscórides renovado*. 6a. edición. Editorial Labor. Barcelona 1033 p.
- Fumarga, S., Goundlach, J.L. (1967). *Lymnaea stagnalis* as a source of infection with Fasciola hepatica. *Acta Parasitológica Polónica* Vol. XV Fasc. 32.
- Gallardo, V.M.C. (1983). Aspectos etnobotánicos y bacteriológicos en la Medicina tradicional en los altos de Chiapas. Tesis profesional. Escuela Nacional de Estudios profesionales IZTACALA, UNAM, México.
- Gitard, R., Coguilhaf, F., Silicani, V., Blanc, B., y Nicoli, R.M. (1966). Human distomatosis due to *Fasciola hepatica* in Corcega. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 58(3).
- Gómez, T., Agudelo, R., Pérez, R.R. y Zeron, F. Bravo (1978). Fasciolosis en México, Estado actual y hiespedes intermediarios, *Rev. Lat. Microbiol.* 20: 121-127.
- González, H.A. (1969). Evaluación de pérdidas económicas ocasionadas - por decomiso total o parcial de hígados en bovinos parasitados - con Fasciola hepatica en el rastro de Ferrería. Tesis profesional Fac. de Med. Vet. y Zoot. UNAM. México.
- Guttowa and B. Boniecka (1975). The effect of Foschlor and McPA upon the embryodevelopment of Fasciola hepatica (trematoda) and Triae hophorus nodulosus (cēstoda). *Bull. Acad. Pol. Sci.* 23(6): 391-397.

- Hadar, I. y Kimberlee, R.S. (1978). Laboratory cultivation of Fossaria cubensis (Pheiffer) (Gastropoda: Lymnaeidae) for use as an intermediate host for Fasciola hepatica. J. Parasitol. 64(6): 1134-1135.
- Harness, E., Hughes, D.L. Doy, T.G. (1975). The demonstration of prehepatic immune response to Fasciola hepatica in the mouse. International J. Parasitol. 6: 15-17.
- Howell, M.J, Sandeman, R.M. y Rajasekariah, G.R. (1977). In vivo and in vitro studies of the effects of immune rat serum Fasciola hepatica. Exp. J. Parasitol. 7: 367-371.
- Hughes and Harness, E. (1973). The experimental transfer of immature Fasciola hepatica from donor mice and hamsters to rats immunised against the donors. Res. Vet. Sci. 220-222.
- Ibarra, V.F., and Jenkins, D.C. (1984). An in vitro screen for new fasciolicidal agents. Z. Parasitenkunde 70: 655-661.
- Kearney, A., Connolly, J.F. y Downey, N.E. (1962). Serum transaminase level in treated Fasciola hepatica infected sheep. Vet. Rec. 134-139.
- Kendall, S.B., and Parfitt, J.W. (1962). The chemotherapy of fascioliasis. Brit. Vet. J. 1-10.
- Landeros y V.M.A., Ibarra, V.F., Escudero, C.J.L. y Millán, S.F. (1981). Determinación de algunos hospederos intermediarios de Fasciola hepatica en la cuenca lechera de Tulancingo, Hgo. Téc. Pec. Méx. 40: 47-51.
- Martínez, M. (1937). Catálogo de Nombres vulgares y científicos de las plantas mexicanas. Ediciones Botas. México.
- Martínez, M. (1956). Flora del Estado de México. Toluca, Dir. de Agric. y Ganadería. 5 V en 1 México.
- Martínez, M. (1953-1958). Las Pinaceas del Estado de México, Toluca, México, Dir. de Agric. y Ganadería 5 V en 1. México.

- Martínez, M. (1969). Las plantas medicinales de México. 5a. Ed. Ediciones Botas. México 630 p.
- Martínez, P.R. (1972). Incidencia de Fasciola hepatica en el municipio de Tierra Blanca, Ver. Tesis profesional. Fac. Med. Vet. Zoot. UNAM. México.
- Matuda, E. (1957-1958). Las labiadas del Estado de México. Dir. de Agric. y Ganadería 3v en 1. México.
- Miranda, G.F. (1979). Contribución al estudio de la incidencia de la fasciolosis hepática en la especie bovina del municipio de San Cristobal de las Casas, Chiapas. Tesis profesional, Fac. Med. Vet. y Zoot. UNAM. México.
- Muñoz, Ch. R. (1973). Incidencia de Fasciola hepática en bovinos sacrificados en el rastro municipal de Durango. Tesis profesional. E.M.V.Z. Universidad de Durango, México.
- N'Dounga, M., Balansard, G., Babadjamain, P. Timon, D.; Gasquet, M.; Boundon, G. (1984). Bidens pilosa: Identification and antiparasitic activity of 1-phenyl-1,3,5-heptatriene. Plant. Med. Phytother. 17(2): 64-75.
- Olsen, W.V. (1977). Parasitología Animal 2 platelmintos, Acantocefalos y Nematelmintos, Biblioteca Veterinaria AEDOS 400 p.
- Osuna, O., D.V.M., Edds. G.T., y Blankespoor, H.D. (1977). Toxic effect of Aflatoxin B. in male holstein calves with prior infection by flukes. Fasciola hepatica. Am. J. Vet. Res. 38(3): 341-349.

- Quiroz, R.H., Castel, B.H.A.; Fernández de C.L. (1973). Efecto de la fasciolosis en la producción láctea en bovinos estabulados. *Revista Vet. UNAM.* 5(2): 31-33.
- Quiroz, R.H. (1984). *Parasitología y Enfermedades parasitarias de animales domésticos.* Editorial Limusa.
- Rzedowski, J. (1978). Claves para la identificación de los géneros de la familia Compositae en México. *Acta científica Potosina Vol. VII. Núms. 1 y 2.*
- Rew, R.S., Raymond H.F. and Timothy, C.M. (1983). Fasciola hepatica: Effects of diamfenetide free amine on in vitro physiology biochemistry and morphology. *Exp. Parasitol.* 55(2): 159-167.
- Reyes, S.R. (1979). Presencia de Fasciola hepatica en ganado bovino, su tratamiento y repercusión económica en el Valle Temascalcingo, Edo. de México. Tesis profesional. Fac. de Med. Vet. y Zoot. UNAM. México.
- Roberts, H.E. (1968). Observations on experimental acute fasciolosis in - sheep. *Br. Vet. J.* 124: 433-449.
- Roseby, F.B. (1970). The effect of fasciolosis on the wool production of merino sheep. *Australian Vet. J.* Vol. 46.
- Ross, J. G. and Todd, J.R. (1968). Epidemiological studies of Fasciolosis. *Vet. Rec.* 82: 695-698.
- Ross, J. G. (1970). The economic of Fasciola hepatica in cattle. *Br. Vet. J.* 126: 13-15.

- Rowcliffe, S.A., Ollerenshaw, C.B. (1960). Observations on the bionomics of the egg of Fasciola hepatica. Ann. Trop. Med. Parasitol. 54(2): 172-181.
- Rushton, B., Murray, M. (1977). Hepatic pathology of a primary experimental infection of Fasciola hepatica in sheep. J. Comp. Path. - 87: 459-470.
- Sánchez, A.A., Herrera, R.D. y Barrios, D.Z. (1976). Incidencia de fasciolosis y su valoración económica a partir de hígados decomisados de ganado Holstein nativo de la región, sacrificados en el Rastro de Tulancingo, Hgo. Téc. Pec. Méx. No. 30.
- Sánchez, S. O. (1980). La flora del Valle de México. Ed. La Prensa. México. 519 p.
- Sewell, M.M.H., Hamond, J.A. and Dinning, C.A. (1968). Studies on the aetiology of anaemia in chronic fasciolosis in sheep. Br. Vet. J. 124: 160-162.
- Sinclair, K.B. (1971). Acquired resistance to Fasciola hepatica in sheep. Br. Vet. J. 127: 125-136.
- Smith, M.A. Clegg (1981) Improved culture of Fasciola hepatica in vitro Zeitschrift fur Parasitenkunde 66: 9-15.
- Soulsby, E.J.L. (1982). Helminths; Arthropods and Protozoa of domesticated animals. Baillieri tindal London.
- Susplugas, C., Balansard, G., Rossi, J.C., Julien, J. Gasquet, M.; and Timon-David, P. (1980). Evidencia of antihelminthic action of serial parts from Imela viscosa: Attribution to a sesquiterpenic acid of this activity. Herba Hung 19(1): 19-34.
- Taylor, E.L. (1965). La Fasciolosis y el Distoma hepático. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma. Italia, 250 p.
- Thorsell, W., Bjorkman, N. and Wittander, G. (1965). Studies on the action of some enzymes on the cyst wall of isolated metacercariae from the liver fluke, Fasciola hepatica L. Brevi comunicazioni. Brief. Reports. 587-589.