

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA**

**ESCUELA DE POSTGRADO**



**DOCTORADO EN CIENCIAS**

**MENCIÓN CIENCIAS VETERINARIAS**

**TESIS**

Efecto del látex de la *Euphorbia splendens* sobre el metabolismo de las proteínas en el *Lymnaea sp.*

Para optar el Grado Académico de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**Presentado por:**

Doctorando: Rosmery Cruz Cerna

**Asesor:**

Dr. Corpus Cerna Cabrera

Cajamarca - Perú

2016

COPYRIGHT © 2016 by  
ROSMERY CRUZ CERNA  
Todos los derechos reservados

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

## ESCUELA DE POSTGRADO



### DOCTORADO EN CIENCIAS

#### MENCIÓN: CIENCIAS VETERINARIAS

### TESIS

Efecto del látex de la *Euphorbia splendens* sobre el metabolismo de las proteínas en el *Lymnaea sp.*

Presentado por:  
Doctorando: Rosmery Cruz Cerna

#### Comité Científico

Dr. Corpus Cerna Cabrera  
Asesor

Dr. Pedro Ortiz Oblitas  
Miembro de Comité Científico

Dr. Seferino Torrel Pajares  
Miembro de Comité Científico

Dra. Cecilia Pajares Acosta  
Miembro de Comité Científico

Dr. Carlos Rosales Loredo  
Miembro de Comité Científico

Cajamarca - Perú

2016

## ACTA DE SUSTENTACIÓN

A:

Mi madre, por el inmenso amor que me brinda  
día a día, por su apoyo incondicional y su  
constante motivación para alcanzar mis metas.

# Í N D I C E

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
Agradecimientos	vi
Lista de ilustraciones	vii
Resumen	xii
Abstrac	xiii
Capítulo I: Introducción	01
Capítulo II: Marco Teórico:	04
1. Antecedentes	04
2. Bases Teóricas	07
Anatomía y fisiología del caracol <i>Lymnaea sp</i>	07
Metabolismo de las proteínas	11
Infección del caracol por <i>Fasciola hepatica</i>	11
Composición y efecto del látex de la <i>Euphorbia splendens</i> , sobre el metabolismo de las proteínas en el <i>Lymnaea sp</i>	13
Capítulo III: Materiales y Métodos	17
1. Tipo de investigación	17
2. Localización	17
3. Unidad de Análisis, población y muestra	18
4. Diseño de la Investigación	18
Capítulo IV: Resultados y Discusión	31
Capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones	46
Listado de Referencias	48

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
<b>Anexos</b>	57
Anexo 1: Obtención de fluido corporal del caracol <i>Lymnaea sp</i>	58
Anexo 2: Método de Bradford para la determinación proteínas totales	59
Anexo 3: Datos de la curva de calibración para Bradford	62
Anexo 4: Pruebas para determinar ácido úrico y urea.	63
Anexo 5: Procesamiento estadístico de información recogida	65

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia por su continuo apoyo en pro de mi superación.

Al Dr. Corpus Cerna, por su continua asesoría en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Al Dr. Pedro Ortiz, por su apoyo con sus conocimientos sobre el tema de estudio del trabajo y sobre todo por sus contactos, que contribuyeron a saldar los obstáculos que se presentaban en el camino de la ejecución del trabajo; y por permitirme desarrollar la investigación en el Laboratorio de Inmunología e Investigación de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Cajamarca.

A cada uno de mis compañeros del Doctorado, por sus opiniones y sugerencias en pro de la mejora del trabajo, y en especial a Heber, por su apoyo incondicional en el manejo de las técnicas de laboratorio.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Cajamarca, por brindar las instalaciones del Laboratorio de Inmunología e Investigación, para desarrollar el trabajo experimental.

A Cristhian por su apoyo y orientación en la crianza y mantenimiento de los caracoles lymneidos bajo condiciones de laboratorio.

A cada una de las personas que de una u otra manera han contribuido para culminar con el presente trabajo de investigación.

## LISTA DE ILUSTRACIONES

FIGURAS	Pág.
Figura 1: Caracoles <i>Lymnaea sp.</i> presentes en acequia de la E.E.B.I. – INIA	19
Figura 2: Cultivo de caracoles <i>Lymanea sp.</i> en condiciones de laboratorio	20
Figura 3: Caracoles <i>Lymnaea sp.</i> expuestos al miracidio de <i>Fasciola hepatica</i>	21
Figura 4: Distribución de la población de lymneidos en los diferentes tratamientos	22
Figura 5: Taper con lodo preparado para mantener a los caracoles	23
Figura 6: <i>Euphorbia splendens</i>	25
Figura 7: Exposición de lymneidos al látex de la <i>Euphorbia splendens</i> en las diferentes concentraciones	27
Figura 8: Caracoles secándose, sobre papel absorbente	28
Figura 9: Fluido corporal de los caracoles separados del material sólido	29
Figura 10: Evaluación de proteínas totales con la técnica de Bradford	30
Figura 11: Equipo Cobas C111	30
Figura 12: Relación de la concentración de proteínas totales en los caracoles <i>Lymnaea sp.</i> , con las concentraciones de látex de la <i>Euphorbia splendens</i> a los que fueron expuestos.	33
Figura 13: Relación de las concentraciones del látex de <i>Euphorbia splendens</i> y concentración de ácido úrico en los lymneidos.	35
Figura 14: Relación de las concentraciones del látex de <i>Euphorbia splendens</i> y concentración de urea en los lymneidos.	35
Figura 15: Relación entre la concentración del látex de <i>Euphorbia splendens</i> y concentración de proteínas totales en los lymneidos infectados con <i>Fasciola hepatica</i> .	38

Figura 16: Relación entre los niveles de Concentración de látex y concentración de ácido úrico en los fluidos del caracol <i>Lymnaea sp.</i> infectados con <i>Fasciola hepatica</i> .	39
Figura 17: Relación entre la concentración de urea y concentración del látex en los fluidos corporales del caracol <i>Lymnaea sp</i> infectados con <i>Fasciola hepatica</i> .	39
Figura 18: Representación de dosis letal media y dosis letal 90, del látex de la <i>Euphorbia splendens</i> , sobre caracoles <i>Lymnaea sp.</i>	44
Figura 19: Curva de calibración de BSA.	62

<b>TABLAS</b>	<b>Pág.</b>
Tabla 1: Concentración de los Parámetros evaluados en los fluidos corporales del caracol <i>Lymanea sp</i> , 24 horas post exposición al látex de <i>Euphorbia splendens</i> .	31
Tabla 2: Diferencias entre el grupo control y las diferentes concentraciones del látex de la <i>Euphorbia splendens</i> – prueba de Tukey	32
Tabla 3: Concentración de los Parámetros evaluados en los fluidos corporales del caracol <i>Lymanea sp</i> infectado con estadíos larvarios de <i>Fasciola hepatica</i> , 24 horas post exposición al látex de <i>Euphorbia splendens</i> .	37
Tabla 4: Comparación de la concentración de proteínas totales en los Lymneidos infectados y no infectados expuestos a las diferentes concentraciones de látex	41
Tabla 5: Medianas de parámetros evaluados en caracoles infectados con estadíos larvarios de <i>Fasciola hepatica</i> versus caracoles libres de estadíos larvarios de <i>Fasciola hepatica</i> y expuestos al látex de <i>Euphorbia splendens</i> .	42
Tabla 6: Número de caracoles <i>Lymnaea sp</i> . muertos después de haber sido expuestos al látex de <i>Euphorbia Splendens</i>	43
Tabla 7: Determinación de absorbancia de los estándares de BSA.	62
Tabla 8: Lymneidos libres de estadíos larvarios de <i>Fasciola hepatica</i> expuestos a diferentes concentraciones de látex de <i>Euphorbia splendens</i>	65
Tabla 9: Lymneidos infectados con estadíos larvarios de <i>Fasciola hepatica</i> , expuestos a diferentes concentraciones de látex de <i>Euphorbia splendens</i> .	66

Tabla 10: Análisis de la varianza de proteína.	67
Tabla 11: Análisis de la Varianza (SC tipo III).	67
Tabla 12: Prueba de Tukey para proteína	68
Tabla 13: Análisis de la varianza ácido úrico	69
Tabla 14: Análisis de la Varianza (SC tipo III)	69
Tabla 15: Prueba de Tukey para ácido úrico	69
Tabla 16: Análisis de Varianza urea	70
Tabla 17: Análisis de la Varianza (SC tipo I)	70
Tabla 18: Prueba de Tukey para urea	70
Tabla 19: Análisis de regresión: proteína (mg/ml)	71
Tabla 20: Coeficientes de regresión y estadísticos asociados (proteína)	71
Tabla 21: Análisis de regresión ácido úrico (mg/dl)	71
Tabla 22: Coeficientes de regresión y estadísticos asociados (ácido úrico)	71
Tabla 23: Análisis de regresión: urea (mg/dl)	71
Tabla 24: Coeficientes de regresión y estadísticos asociados (urea)	71
Tabla 25: Análisis de la varianza proteína	72
Tabla 26: Análisis de la Varianza (SC tipo I)	72
Tabla 27: Prueba de Tukey para proteína	72
Tabla 28: Análisis de la varianza para ácido úrico	73
Tabla 29: Análisis de la Varianza (SC tipo I)	73
Tabla 30: Prueba de Tukey para ácido úrico	73
Tabla 31: Análisis de Varianza para urea	74

Tabla 32: Análisis de la Varianza (SC tipo I)	74
Tabla 33: Prueba de Tukey para urea	74
Tabla 34: Análisis de regresión: proteína (mg/ml)	75
Tabla 35: Coeficientes de regresión y estadísticos asociados (proteína)	75
Tabla 36: Análisis de regresión ácido úrico (mg/dl)	75
Tabla 37: Coeficientes de regresión y estadísticos asociados (ácido úrico)	75
Tabla 38: Análisis de regresión: urea (mg/dl)	75
Tabla 39: Coeficientes de regresión y estadísticos asociados (urea)	75
Tabla 40: Prueba de Normalidad: Kolmogorov-Smirnov	76
Tabla 41: Comparación de medianas por la prueba de Wilcoxon para muestras independientes	76
Tabla 42: Concentraciones del látex de <i>Euphorbia splendens</i> contra caracoles <i>Lymnaea sp.</i>	77
Tabla 43: Coeficientes estimados para la concentración del látex.	77
Tabla 44: Estimaciones del nivel de concentración del látex contra caracoles.	78

## RESUMEN

### EFFECTO DEL LÁTEX DE LA *Euphorbia splendens* SOBRE EL METABOLISMO DE LAS PROTEÍNAS EN EL *Lymnaea sp.*

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Inmunología e Investigación de la Universidad Nacional de Cajamarca, de diciembre 2012 a agosto 2014. El objetivo del estudio fue determinar el efecto del látex de la *Euphorbia splendens* sobre el metabolismo de las proteínas en *Lymnaea sp.*, para lo cual se evaluó los niveles de proteínas totales, ácido úrico y urea en los caracoles. Se estableció dos grupos de caracoles, el primero, libres de estadíos larvarios de *Fasciola hepatica* y el segundo infectados con estadíos larvarios del parásito; con 11 tratamientos cada uno (determinados por las diferentes dosis del látex) y un control, haciendo en total 480 lymneidos. En el primer grupo se determinó que los caracoles expuestos a mayor concentración de látex tienen un mayor nivel de proteínas y un menor nivel de ácido úrico y urea, lo que indica la alteración del metabolismo de las proteínas y por ende intoxicación del caracol y muerte de este; en el segundo grupo, los niveles de proteínas totales se incrementaron a medida que se incrementó la concentración del látex, pero los niveles de ácido úrico y urea se mantuvieron constantes, esto se podría explicar porque la infección por *Fasciola* incrementa el metabolismo del caracol, poniéndolo en alerta para hacer frente a cualquier estrés; pero el metabolismo proteico igual sigue alterándose debido a que la concentración de proteínas totales se sigue incrementando, debido a que no hay una degradación de la mismas, y esta sería la causa de la muerte del caracol. Al comparar las variables de los dos grupos (proteína total, ácido úrico y urea), se observó diferencia significativa entre ellas ( $P < 0,001$ ); siendo más notoria la alteración en los caracoles libres de *Fasciola*; además se ha determinado que la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) es de 1,9 mg/l y la dosis letal ( $DL_{90}$ ) es de 4,85 mg/l. Se concluye que el látex de la *Euphorbia splendens* es un molusquicida, que actúa interfiriendo en el metabolismo proteico de los lymneidos.

**Palabras clave:** látex, *Euphorbia splendens*, lymneidos, metabolismo, proteínas, *Fasciola hepatica*

## ABSTRACT

### EFFECT OF LATEX OF *Euphorbia splendens* ON THE METABOLISM OF PROTEINS IN THE *Lymnaea sp.*

This research was conducted at the Laboratory of Immunology and Research of the National University of Cajamarca, between December 2012 and August 2014. The objective of the present study was to determine the effect of *Euphorbia splendens* latex on protein metabolism of *Lymnaea sp.*; and comprised the analysis of the levels of total protein, uric acid and urea in these snails. Two groups of snails were set up, the first group was free from *Fasciola hepatica* and the second group was infected with the parasite; each group comprised 11 treatments (determined by different doses of latex) and a control, in total 480 lymnaeid. In the first group, snails exposed to high concentrations of latex had high levels of protein and low levels of uric acid and urea, indicating an alteration of protein metabolism and thus intoxication and death of the snail; in the second group, the level of total protein increased as the concentration of latex increased, but the levels of uric acid and urea remained constant, this could explain why infection with *Fasciola hepatica* increases the metabolism of the snail, preparing it to deal with any stress; however, the alteration of protein metabolism which results in continuous increase in total protein concentration in snails, due to altered protein degradation, may be the reason of the death of the snails. When comparing the variables of the two groups (total protein, uric acid and urea), there was a significant difference between them ( $P < 0,001$ ); being this alteration more noticeable in snails free from *Fasciola hepatica*; also, it has been determined that the median lethal dose ( $LD_{50}$ ) is 1,9 mg/l and the lethal dose ( $LD_{90}$ ) is 4,85 mg/l. It is concluded that *Euphorbia splendens* latex is a molluscicide; that acts by interfering the metabolism of proteins in lymnaeids.

**Keywords:** latex, *Euphorbia splendens*, lymnaeids, metabolism, proteins, *Fasciola hepatica*

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria, ocasionada por la *Fasciola hepatica* o *Fasciola gigantica*; de distribución mundial, y muy común en la sierra norte del país, que afecta a la mayoría del ganado: vacunos, ovinos, caprinos, equinos, animales silvestres, e incluso al hombre (Marcos et al. 2007).

En Cajamarca, se tiene que la frecuencia de presentación de la fasciolosis en el ganado vacuno es del 77% y del 45% en ovinos (Huamán 2011); mientras que en Baños del Inca se tuvo una frecuencia de 80,6% para vacunos y de 61,9% en ovinos (Chuquiruna 2011), demostrando de esta manera que esta enfermedad es endémica en la región. Por otra parte, esta enfermedad es responsable de muchas pérdidas económicas, que se estima son mayores a 50 millones de dólares al año (Espinoza et al. 2010), por los decomisos de hígados en mal estado de los animales sacrificados en los centros de beneficio, así como por las pérdidas de peso de los animales infectados; y sumado a estas pérdidas se encuentra el gasto efectuado por los ganaderos para el tratamiento (desparasitación) periódico de sus animales.

En humanos, la fasciolosis es una enfermedad emergente debido a que la presentación de casos positivos ha ido en aumento en los últimos años, siendo en la actualidad una de las tres zoonosis más importantes que afectan el hígado en el país; por lo tanto debe considerarse la ejecución de programas de control orientadas a interrumpir el ciclo biológico (Marcos et al. 2007). Así mismo, se estima que existen entre 2,6 y 17 millones de personas infectadas en el mundo, y que cerca de 90 millones se encuentran en riesgo (Duthaler et al. 2010); en nuestro país, la fasciolosis es una enfermedad endémica en comunidades rurales, siendo una de ellas Cajamarca, la cual presenta una prevalencia entre 6,3% y 47,7%, donde los niños de edad escolar son los más afectados (Cornejo et al. 2010); en un estudio más reciente se tiene datos de que la prevalencia en humanos que viven en áreas rurales entre los 2627 a 3061 m.s.n.m., para la región es de 6,7% a 47,7% (González et al. 2011).

Para las medidas de control de esta enfermedad, se tiene dos vías, una mediante el uso de antihelmínticos o fasciolicidas, y la segunda que sería a nivel del control del hospedero intermediario (Urquhart et al. 2001). Dentro de los fasciolicidas más usados

en nuestro medio tenemos al triclabendazol, el cual ha dado buenos resultados en el tratamiento por mucho tiempo, pero en los últimos tiempos, nuevos estudios han dado indicios de que el parásito (*Fasciola hepatica*) se está volviendo resistente a este producto químico, como lo mencionan Duthaler et al. (2010) en su trabajo de investigación, en donde se reporta una eficacia del producto del 30%; lo cual está relacionado con el uso excesivo del triclabendazol durante muchos años, y sobre todo en nuestra realidad a la sub-dosificación por la estimación del “peso al ojo” (Rojas 2012; Mamani & Condori 2009). Así mismo, se tiene información de que la resistencia al triclabendazol en la región de Cajamarca, para el caso del ganado vacuno ha sido del 81%, considerando a este producto en una escala de eficacia moderada, por lo cual no es recomendable el uso del producto en el tratamiento de la enfermedad (Terán 2011), mientras que en el trabajo realizado por Ortiz et al. (2013), se reportó una eficacia del triclabendazol del 25,2%; por otra parte en un estudio similar al de Terán (2011), realizado en el Fundo Tartar de la Facultad de Ciencias Veterinarias de Cajamarca, se tuvo una eficacia de 0 a 6,3% con relación al triclabendazol, colocando al producto en la escala de insuficientemente activo, reafirmando la recomendación de no usar este producto en el tratamiento de la fasciolosis (Calderón 2011).

Por otra parte, como se mencionó líneas arriba, una segunda vía de control de la enfermedad, sería a través del caracol *Lymnaea sp.*, el cual juega un papel importante en la continuidad del ciclo biológico de la *Fasciola hepatica* como hospedero intermediario y por ende en la prevalencia de la enfermedad.

En la región de Cajamarca, estudios recientes demuestran que el *Lymnaea viatrix* no es la única especie que hace el papel de hospedero intermediario, sino que también juegan este rol los caracoles *Lymnaea neotropica*, y *Galba truncatula*, los cuales son morfológicamente similares (Bargues et al. 2012); por lo que, para diferenciarlos uno del otro se debe contar con métodos de laboratorio más sofisticados como es por ejemplo el uso del análisis del gen de la citocromo oxidasa I y secuenciación del ADN (Correa et al. 2011; Velásquez et al. 2011).

Por otra parte se tiene que la región de Cajamarca, es una zona que presta las condiciones favorables para que se presente el desarrollo de los caracoles del género *Lymnaea* y como consecuencia se dé la continuidad del ciclo biológico de la *Fasciola hepatica* y por ende, como ya mencionamos anteriormente, se presente la fasciolosis. En

tal sentido, con el presente trabajo se buscó brindar una alternativa para el control de la *Fasciola hepatica*, a través del control del desarrollo del hospedero intermediario (*Lymnaea sp.*).

En la actualidad, se cuenta con muchos estudios sobre los efectos molusquicidas de productos químicos, así como de plantas, sobre un sinnúmero de especies de caracoles, que actúan como hospederos intermediarios de trematodos; en especial, sobre el género *Biomphalaria*, hospedero intermediario del *Schistosoma mansoni*, sobresaliendo el uso de las plantas de la familia *Euphorbiaceae*, dentro de las que destacan: *Euphorbia splendens*, *Euphorbia tirucalli*, *Euphorbia royleana*, entre otras, por su potencial molusquicida sobre esta especie y otras relacionadas. Estas plantas también han sido probadas sobre algunas especies del género *Lymnaea* como son *L. acuminata*, y el *L. columella*, dando buenos resultados como molusquicidas (Seshagirirao & Prasad 2001; Mendes et al. 1997; Vasconcellos & Amorim 2003); sin embargo se desconoce cuál es el mecanismo de acción del látex de estas plantas sobre los lymneidos, y no se tiene estudios de las otras especies que hacen el papel de hospedero intermediario de la *Fasciola hepatica* en la región de Cajamarca; por estas razones, se planteó la presente investigación con el objetivo de determinar el efecto del látex de la *Euphorbia splendens* sobre el metabolismo de las proteínas en el caracol *Lymnaea sp.*, considerando la condición de infectados y no infectados con *Fasciola hepatica* de los mismos.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 1. ANTECEDENTES

Desde hace algunos años los investigadores se han preocupado por tratar de encontrar la forma de controlar las parasitosis producidas por trematodos que afectan al ganado como es *Fasciola hepatica* y otros, a través del control del hospedero intermediario que en este caso son caracoles de diferentes géneros *Lymnaea*, o *Biomphalaria*, entre otros; probando inicialmente productos químicos como la niclosamida que fue probada sobre *Biomphalaria glabrata* y *Melanoides tuberculata*, dando buenos resultados (Giovanelli et al. 2002), pero tiene un inconveniente para el ecosistema, debido que afecta a otras especies, y por ende a la diversidad de fauna presente en campo. Por otra parte se han estudiado cerca de 1426 especies de plantas, a fin de encontrar un derivado vegetal que actúe como molusquicida (Baptista et al. 1994), entre las que tenemos: la *Physalis angulata* L, que se probó sobre *B. glabrata*, teniendo el 100% de mortalidad de los animales con su extracto acetónico (A Dos Santos et al. 2003); así mismo se tiene al *Laurus azorica* (laurel de azores) o al *Juniperus brevifolia* (enebro) que sus aceites esenciales tuvieron efectos molusquicidas contra el *Radix peregra* o *Lymnaea peregra* en las islas de Azores (Teixeira et al. 2012); entre otras, siendo las plantas de la Familia Euphorbiaceae las que cuentan con un mayor número de especies, el cual es cerca del 65% del total de la familia (Seshagirirao & Prasad 2001), en donde, la *Euphorbia splendens* es una de las plantas molusquicidas más promisorias (Baptista et al. 1994).

La *Euphorbia splendens*, también conocida como: Corona de Cristo, Corona de Espinas, Espinas de Cristo, entre otros nombres; es una planta oriunda de la región de Inselberge, en Madagascar, Asia; pero que en la actualidad es de distribución mundial, es una planta exótica, que se encuentra en diversos invernaderos y casas; ya que su cultivo es simple y fácil; se propaga de forma vegetativa, es decir a través de esquejes (Vasconcellos & Amorim 2003).

El látex de la *Euphorbia splendens* es considerado como medicinal, molusquicida y aunque algunas investigaciones indican que puede causar problemas

cancerígenos (Soare & Dobrescu 2009), e irritación de la piel por la presencia de una fracción alcaloidea (Rojas et al. 2008); por otro lado, estudios específicos sobre el látex de la *Euphorbia splendens*, han demostrado que es uno de los más seguros y de alto poder molusquicida, para el control del caracol de la especie *Biomphalaria*, en concentraciones de 0,5 ppm (Vasconcelos & Schall 1986; Schall et al. 2001), así mismo hay estudios que muestran que también tiene el mismo efecto sobre el caracol *Lymnaea columella*, en concentraciones que varían de 0,55 mg/l en verano a 1,51 mg/l primavera (Vasconcellos & Amorim 2003); indicando además que las concentraciones que se usan para el control de los caracoles *Biomphalaria* son menos nocivas para el resto de organismos acuáticos, ya que se requiere dosis superiores a 100 ml/l de látex (Oliveira-Filho & Paumgarten 2000; De Nardi 2011).

Hay otros estudios que indican el efecto molusquicida de otra planta de la familia *Euphorbiaceae*, como es la *Euphorbia tirucalli*, en base a los cambios sufridos en el metabolismo de los carbohidratos y proteínas del *Lymnaea acuminata* (Tiwari & Singh 2005), en este contexto también se ha evaluado el efecto tóxico de la *Euphorbia hirta* (Singh et al. 2005), así mismo el extracto acético de esta planta, en combinación con el taraxerol, producto de la *Codiaeum variegatum*, perteneciente a la misma familia, ocasiona alteraciones en el aspecto reproductivo del *Lymnaea acuminata*, razón por la cual se recomienda su uso como controlador del hospedero intermediario de la fasciolosis (Chauhan & Singh 2011).

El efecto molusquicida del látex de la *Euphorbia splendens* o también denominada *Euphorbia milli*, está influenciado por el pH de la concentración de la dosis letal, observándose que a un pH de 8, la concentración de la dosis letal debe ser de 10,3 ul/l, mientras que a un pH de 6, la concentración de la dosis letal debe ser de 3,2 ul/l; por lo que se debe tratar de estandarizar las concentraciones de las dosis letal a un pH de 7 (Vasconcellos et al. 2003); además el efecto molusquicida del látex, está influenciado por cambios producidos en factores ambientales como: temperatura del agua, contenido de materia orgánica dentro de la misma (se disminuye la dosis letal a la mitad por cada 10°C de temperatura que se incrementa, y a mayor concentración de materia orgánica, la dosis se incrementa); también influye en la concentración de la dosis, la edad del caracol, son más susceptibles los caracoles viejos que los jóvenes (Oliveira-Filho et al. 1999). En similar estudio sobre la estabilidad de la solución acuosa de otra especie de la familia *Euphorbiaceae*, como es la *Euphorbia myrsinites*, en donde se encontró que la

solución acuosa del látex, es inestable a temperatura ambiente y que pierde rápidamente su efectividad como molusquicida (alrededor del 50% después de 7 días a 20 ° C) (Patel et al. 2011). Por otra parte es necesario mencionar que el látex pierde su actividad molusquicida por efecto de la luz, es decir, su principio activo es fotodegradable; mientras que si el látex es mantenido en condiciones de refrigeración es estable por espacio de 2 años (Oliveira-Filho & Paumgarten 1997).

Bajo condiciones de campo, se ha observado la necesidad de hacer una repetición de la aplicación del látex de la *Euphorbia splendens*, a fin de que el poder molusquicida de esta sea efectiva (Mendes et al. 1997); así mismo se ha demostrado que el látex filtrado de la *Euphorbia splendens*, no tiene mayor efecto molusquicida, ya que si bien es cierto se reduce el número de caracoles del género *Biomphalaria glabrata*, este se recupera rápidamente; pero si se usa el látex no filtrado, en dos aplicaciones, con un intervalo de 2 semanas; en dosis de 5 ppm, la población del caracol desaparece y no reaparece hasta 14 meses después de la aplicación, comprobando que el látex crudo no filtrado es más potente que el filtrado (Schall et al. 2001).

A la vez se ha observado que el látex de la *Euphorbia splendens* (Corona de Cristo) ocasiona irritación a nivel de piel y de los ojos en conejos, (Freitas et al. 1991), también se ha evaluado el látex para comprobar sus efectos tóxico y mutagénico en células de mamíferos in vitro e in vivo, comprobando en la investigación que el látex no tiene mayor efecto mutagénico en células de mamíferos in vitro e in vivo, y por ende para el hombre (Zamith et al. 1996). Sin embargo en otros estudios, relacionados con la familia *Euphorbiceae*, específicamente con el extracto metanol de la *Euphorbia schimperiana*, sobre ratones suizos albinos, da indicios de tener un potente efecto mutagénico, a pesar de tener solo un ligero efecto tóxico sobre estos (Ekram & Najia 2006); por otra parte Patel et al. (2011) recomiendan tener cuidado en la manipulación del látex de la *Euphorbia myrsinites*, debido a las evidencias de ser citotóxico; es importante reiterar que la manipulación del látex se haga cuidadosamente, a fin de evitar complicaciones posteriores.

## 2. BASES TEÓRICAS

### ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL CARACOL *Lymnaea sp.*

Antes de ingresar a tratar la anatomía y fisiología el caracol *Lymnaea*, es importante conocer su clasificación taxonómica (Berg 1994):

- Phylum: *Mollusca*
- Clase: *Gastropoda*
- Subclase: *Pulmonata*
- Orden: *Basommatophora*
- Familia: *Lymnaeidae*
- Género: *Lymnaea*
- Especie: dentro de las que destacan:
  - ✓ *Lymanaea viatrix*
  - ✓ *Lymnaea neotropica*
  - ✓ *Lymnaea acuminata*
  - ✓ *Lymnaea columella*

Esta familia tiene distribución mundial y su importancia médica radica en su rol como huéspedes intermediarios de parásitos trematodos, entre los que se destaca la *Fasciola hepatica* (Berg 1994).

Como ya se mencionó en la clasificación taxonómica, el caracol *Lymnaea sp.* pertenece a la familia *Lymnaeidae*, son animales acuáticos de respiración pulmonar que carecen de opérculo; cuentan con, dentro de sus características morfológicas, una concha enrollada en espiral levantada, es un animal dextrógiro, debido a que la abertura de la concha se ubica al lado derecho (Ramos 2002; Borchert 1964).

Los caracoles de este género son animales de concha pequeña, opaca moderadamente nacarada, la apertura es ovalada, menos de la mitad de la altura de la concha, su labio externo es afilado y el labio columelar es volteado. Los adultos con casi 6 anillos, miden de 8 a 12 mm de longitud (Berg 1994).

Por otra parte este grupo de moluscos presentan una gran diversidad en la morfología de la concha, así como en la anatomía del sistema reproductor, caracteres en

los que se basa la taxonomía clásica, pero que no son suficientes para identificar especies estrechamente relacionadas y por ende se debe recurrir al uso de métodos moleculares para realizar una correcta definición (Correa et al. 2011), teniendo como ejemplo de método molecular, el uso del análisis del gen de la citocromo oxidasa I y PCR, ya que es un método rápido, confiable y sencillo para la diferenciación respectiva (Velásquez et al. 2011).

Estos caracoles viven en barro húmedo o en lugares de aguas poco profundas y no estancadas. En condiciones de sequía o frío, tanto el caracol como los estadios intermediarios reducen su actividad metabólica pudiendo sobrevivir varios meses, para luego reaparecer cuando se mejoran las condiciones de humedad e incremento de la temperatura (Olaechea 2004).

En cuanto a la fisiología del caracol *Lymnaea sp.* como tal se tiene poca referencia, la información que se encuentra en general es sobre la clase y subclase, motivo por el cual, en los siguientes párrafos se tratará de describir de forma genérica algunos aspectos fisiológicos de este tipo de caracol.

Sobre el intercambio gaseoso de los animales de la sub clase Pulmonata, se puede afirmar que reciben su nombre debido a que la cavidad paleal se ha transformado en un pulmón, es decir los bordes de la cavidad paleal se fusionaron por su parte posterior, quedando un pequeño orificio en el lado derecho, denominado neumostoma. La branquia desaparece y se vasculariza el techo de la cavidad paleal. La ventilación se da cuando el animal arquea y aplana el suelo de la cavidad paleal (es decir el dorso del cuerpo del animal). En los lymneidos estos acuden a la superficie del agua para realizar el intercambio gaseoso; el neumostoma permanece cerrado mientras el caracol está sumergido, y las inmersiones pueden durar de 15 minutos a más de una hora (Barnes & Ruppert 1996).

En cuanto a la alimentación de estos caracoles, se dice que son herbívoros y lo realizan a través de una ránula, que no es otra cosa que la boca; teniendo una digestión extracelular con la acción de un sin número de enzimas producidas en las glándulas salivales, bolsas esofágicas y divertículos digestivos. La digestión extracelular se da en el estómago; mientras que la absorción y digestión intracelular se da en los divertículos digestivos (Barnes & Ruppert 1996).

Con relación al sistema excretor del caracol, se tiene que cuenta con dos riñones denominados nefridios, la estructura del nefridio es un saco ciego, con paredes bastante plegadas para incrementar la superficie dedicada a la excreción. El nefridio está conectado con la cavidad pericárdica por medio de un conducto reno pericárdico. En los pulmonados el uréter se prolonga a lo largo de la pared derecha del manto, para ir a desembocar en la parte anterior de la cavidad paleal, en las proximidades del ano y del neumostoma (Barnes & Ruppert 1996).

Estos caracoles eliminan cantidades considerables de agua a través de la evaporación, al producir el rastro de moco que emplean para ir reptando; por lo cual muchos pulmonados necesitan vivir en medios húmedos. Durante las épocas de sequía, el caracol interrumpe su actividad, bien por estivación o hibernación; para lo cual lo primero que hace es sepultarse en el suelo o trepar por la vegetación, y después tapa la abertura de su concha juntando los bordes del manto y secretando una película de moco que se endurece al secarse. La estivación puede durar varios meses y su reactivación coincide con los cambios en la temperatura y aumento de la humedad o mediante vibraciones como las que producen las gotas de lluvia sobre la concha (Barnes & Ruppert 1996).

En los gasterópodos, el corazón se encuentra en la parte anterior de la masa visceral; del ventrículo sale una aorta posterior que irriga la masa visceral y una anterior que irriga la cabeza y el pie. La sangre además de su papel de transporte, en la región de la cabeza y el pie, juega también el papel hidrostático, el sistema arterial se resuelve para formar una serie de senos sanguíneos, mientras que en la zona de la masa visceral, donde la sangre cumple principalmente el papel de transporte, se mantiene confinada en el interior de unos pequeños vasos sanguíneos. En los pulmonados, el flujo de retorno al corazón desde los senos venosos atraviesa la red de capilares que se encuentran en el techo del pulmón. Así mismo en los pulmonados el pigmento respiratorio es la hemocianina que se encuentra disuelta en el plasma (Barnes & Ruppert 1996).

En cuanto al sistema nervioso se puede mencionar que tienen un par de ganglios cerebroideos, situados en la región posterior del esófago, de los que salen nervios que inervan los ojos, tentáculos, estatocistos y ganglios bucales, estos últimos inervan los músculos de la ránula. De cada ganglio cerebroideo, sale un cordón nervioso denominado Conectivo pedio, que inervan los ganglios pedios, que a su vez inervan los

músculos del pie. Así mismo de los ganglios cerebroideos sale un par de conectivos que van a los ganglios pleurales, encargados de inervar el manto y el músculo columelar. De los ganglios pleurales salen dos cordones nerviosos que van a inervar los ganglios viscerales (Barnes & Ruppert 1996).

Con respecto al comportamiento reproductivo del caracol tenemos que es una especie hermafrodita, pero que actúa generalmente de macho cuando es joven o es de menor edad que su pareja en el momento de la cópula (Hermann et al. 2009); por otra parte Barnes & Ruppert (1996) menciona que los pulmonados son individuos hermafroditas simultáneos, aunque su gónada no puede producir a la vez espermatozoides y óvulos; normalmente hay una transferencia mutua de esperma; ponen los huevos en el interior de cápsulas y el desarrollo es directo.

En cuanto al comportamiento del caracol frente a factores estresantes (mayormente presencia de predadores o cautiverio), en un estudio realizado sobre el *Lymnaea stagnilis*, se determinó que este se va adaptando, para lo cual sufre cambios en su metabolismo y sobre todo en su memoria; manteniendo de esa manera la habilidad para detectar y responder apropiadamente frente a factores estresantes (Lukowiak et al. 2008).

Con relación a la inmunología de los gasterópodos, se tiene que desarrollan únicamente una respuesta inmunológica innata, esto debido al tamaño de su genoma y su tamaño corporal, así mismo su complejidad no permite el desarrollo de un número adecuado de células necesarias para una respuesta inmunológica adquirida; la respuesta innata de estos moluscos es altamente eficiente, por su habilidad para distinguir entre lo propio y no propio, basando su respuesta en dos mecanismos, uno celular (destaca fagocitos) y otro humoral, donde se ha identificado la presencia de una antiproteasa - 2 macroglobulina y proteínas relacionadas con el fibrinógeno (Antón & Salazar-Lugo 2009).

Por otra parte cuando se ve la relación entre el caracol y los trematodos, generalmente se tienen estudios que avalan que una de las formas de reacción del caracol (*Galba truncatula*) es el gigantismo, aunque también podría haber influencia sobre la fertilidad de los caracoles, lo cual conllevaría a que se altere su metabolismo con la finalidad de seguir viviendo (Chapuis 2009).

## **METABOLISMO DE LAS PROTEÍNAS**

La degradación y síntesis continua de las proteínas celulares se da en todas las formas de vida (Rodwell 2009), y esto equivale a conocer de manera integral el metabolismo del nitrógeno (Rondoy 2014). La degradación de las proteínas conlleva a la producción de aminoácidos libres, de los cuales el 75% son reutilizados por los organismos, el sobrante es rápidamente degradado, donde el nitrógeno se convierte en amoníaco, urea y/o ácido úrico; y de esta manera puede ser excretado del organismo (Rodwell 2009).

El catabolismo de los aminoácidos se da por procesos de: transaminación, desaminación, transporte de amoníaco, el cual posteriormente es transformado en urea y/o ácido úrico y como se mencionó líneas arriba, así es eliminado del organismo (Rondoy 2014).

Algunas enfermedades están relacionadas con la pérdida de proteína corporal y aumento del catabolismo de los aminoácidos, conllevando a un incremento de los productos de las reacciones del catabolismo de éstos en sangre (Rondoy 2014).

## **INFECCIÓN DEL CARACOL POR ESTADIOS LARVARIOS DE *Fasciola hepatica***

El ciclo biológico de la *Fasciola hepatica* consta de cinco fases: i) salida de los huevos al medio ambiente con su respectiva maduración del embrión; ii) nacimiento del miracidio e infección del hospedero intermediario; iii) desarrollo y multiplicación del parásito dentro del hospedero intermediario; iv) emergencia de la cercaria y su enquistamiento; v) ingestión de la metacercaria por el hospedero definitivo y el desarrollo de las formas adultas del parásito. Estas fases requiere, para lograr el éxito, de factores ambientales favorables; por ejemplo para que se produzca la incubación del huevo en el medio ambiente debe contar con factores óptimos como la temperatura, humedad y tensión de oxígeno principalmente, si estas condiciones se da, entonces emergerá el miracidio, que es el primer estadio larval de *Fasciola hepatica* y el responsable de infectar al caracol *Lymanaea*, donde se lleva a cabo la tercera fase del ciclo del parásito, y que el éxito de la infección de un miracidio puede producir hasta 4000 metacercarias, en condiciones ambientales favorables (Andrews 1999).

Se conoce que el miracidio tiene geotropismo negativo, se impulsa por el agua a través de sus cilios (Urquhart et al. 2001); la acción fototrópica pasiva de la mancha ocular atrae al miracidio hacia la superficie del agua, nadando de un lado al otro hasta encontrar al caracol (Quiroz 2003). Por otra parte debemos recordar que el miracidio no se alimenta y para continuar su evolución necesita encontrar al caracol, para lo cual es guiado por factores quimiotácticos (Urquhart et al. 2001).

En el trabajo de recopilación de información de Fredes (2004) se menciona que la infección del caracol por el miracidio se da a través de la piel. Así mismo se conoce que el miracidio se adhiere por succión a las células epiteliales del caracol y las destruye, probablemente con enzimas secretoras por el órgano apical del tubo digestivo del miracidio; otra forma de ingresar puede ser a través de la cavidad respiratoria con la ayuda del botón cefálico; una vez que penetra el miracidio pierde el epitelio ciliado que lo rodea, de manera que el empuje final es realizado por el esporocisto juvenil sin ciliatura (Soulsby 1982; Quiroz 2003; Borchert 1964), el proceso de penetración demora aproximadamente 30 minutos (Urquhart et al. 2001).

La evolución cuantitativa y cualitativa del desarrollo del parásito dentro del caracol, además de depender de la humedad y temperatura ambiental, también guarda estrecha relación con la condición nutricional del caracol y su edad; por lo tanto es mejor cuando los caracoles se encuentran en depósitos acuáticos ricos en algas y a una temperatura favorable, antes que en medios secos y fríos y en arroyos claros (Quiroz 2003; Borchert 1964).

Un vez que ha ingresado el miracidio al caracol, pierde los cilios y se transforma en un saco alargado, denominado esporocisto, que contiene un cierto número de células germinales, las cuales se transforman en redias y éstas son liberadas en la glándula digestiva, de donde migran al hepatopáncreas del caracol; ocasionando un daño considerable a la glándula y convirtiéndose en fuente de infecciones secundarias. Las redias dan lugar a las cercarías que son el producto de sus células germinativas; aunque en condiciones favorables estas células germinativas pueden dar lugar a una segunda generación de redias antes de dar cercarías (Andrews 1999; Urquhart et al. 2001). Después de 6 a 8 semanas las cercarías abandona a las redias a través de su abertura tocológica (poro de nacimiento) y al caracol por su aparato respiratorio (Quiroz 2003). El estímulo necesario para que las cercarías emerjan del caracol en gran número

depende de la especie, aunque habitualmente se da por un cambio en la temperatura ambiental o la intensidad luminosa (Urquhart et al. 2001).

Una vez que el caracol es infestado, la producción de cercarías se da de forma indefinida, aunque es importante mencionar que la mayoría de caracoles mueren como consecuencia de la destrucción del hepatopáncreas producto de la migración de las redias (Andrews 1999; Urquhart et al. 2001). Por otra parte se tiene que los caracoles infestados, en general, tienen mayor movilidad que los no infestados, lo que hace suponer que esta intranquilidad influye intensamente sobre el metabolismo del caracol por lo que muere prematuramente (Borchert 1964).

Las cercarías que salen del caracol se mueven libremente por el agua (nadan) hasta encontrar una superficie solida (vegetación), esto toma un tiempo aproximado de una hora, en donde se adhieren y pierden la cola transformándose en metacercarias, las cuales pueden vivir por meses en espera de ser ingeridas por el hospedero definitivo (Urquhart et al. 2001).

### **COMPOSICIÓN Y EFECTO DEL LÁTEX DE LA *Euphorbia splendens*, SOBRE EL METABOLISMO DE LAS PROTEÍNAS EN EL *Lymnaea sp.***

Dentro de los compuestos del látex se distingue básicamente dos fracciones, una proteica y otra no proteica, mostrando que la que tiene mayor poder molusquicida es la fracción proteica denominada “Milin” (con un promedio de vida del caracol *Biomphalaria glabrata*, después del tratamiento, de máximo 13 días), la que puede ser potencializada con la adición de una pequeña porción del extracto no proteico, mejorando el efecto molusquicida (ocasionando la muerte en un máximo de 5 días del 100% de los caracoles). Por otro lado la fracción no proteica que son alcaloides principalmente solo ocasionan cambios en el comportamiento fisiológico y físico del caracol, más no conducen a la muerte del mismo (Yadav & Jagannadham 2008). Se ha comprobado que produce irritación a nivel de piel y ojos (Rojas et al. 2008); además que a dosis superiores a 0,5% la solución acuosa del látex de la *Euphorbia splendens*, produce irritación a nivel de piel y ojos en conejos (Freitas et al. 1991). La fracción no proteica del látex de la *Euphorbia splendens* ha demostrado que es causante de alergias

en el hombre, por lo que hay que tener cuidado con la manipulación del látex (Delgado & Paumgarten 2014).

La fracción proteica, especialmente el Eumili o milin, es un monómero proteico, con una masa de 30 kDa, y que induce una mionecrosis, con infiltración de leucocitos, produciendo lisis de las células después de 24 horas de exposición a la misma (Costa 2010).

Se ha demostrado que el principio molusquicida del látex de la *Euphorbia splendens* es estable en las diferentes estaciones del año, teniendo valores de dosis letal de 1,14 ppm en primavera, 1,02 ppm en otoño, 1,09 ppm en invierno y 1,07 ppm en verano; estas dosis fueron estudiadas en el caracol del género *Biomphalaria teganophila*, en la ciudad de Belo Horizonte – Brasil (Schall et al. 1992); así mismo la propiedad molusquicida del látex de la *Euphorbia splendens*, se mantiene en hábitats de aguas tranquilas así como de aguas corrientes, con la salvedad de que se debe hacer la modificación correspondiente de las concentraciones y del tiempo de exposición de los caracoles *Biomphalaria* al látex de la planta (Mendes et al. 1992; Baptista et al. 1992); es importante indicar que también es estable al modificar el ámbito geográfico (Schall et al. 1992).

Schall et al. (1998) en un estudio posterior, donde el látex se somete a liofilización, y se prueba diferentes dosis como molusquicida, en diferentes especies de caracoles del género *Biomphalaria* que actúan como hospederos intermediarios de *Schistosoma mansoni* y *Schistosoma haematobium*; dando como resultado que la eficacia del látex para este estudio, depende de la especie de caracol y de la concentración del látex; por otra parte también se observó en este estudio el efecto del látex en donde ocasionó la mortalidad de huevos y embriones del caracol *Biomphalaria glabrata*, en concentraciones de 1500 ppm.

Como se ha mencionado líneas arriba, la familia de las *Euphorbiceaes*, tienen propiedades altamente molusquicidas y que pueden ser alternativas viables al uso de molusquicidas químicos, ya que además el látex de estas plantas también tiene efecto sobre los embriones de los caracoles del género *Biomphalaria*, causando una alta tasa de malformaciones, que conllevan a la muerte de los embriones (posiblemente sea parte de

su mecanismo como molusquicida) hecho que no ocurre cuando se usa los molusquicidas químicos (Oliveira-Filho et al. 2010).

Así mismo cuando se trabaja con el látex de forma cruda, se conoce evidencias de que las consecuencias en el caracol va a depender de la dosis que se aplique, en la aplicación de dosis sub letales, se tiene que altera el metabolismo del glucógeno, piruvato, lactato, proteínas totales, nivel de aminoácidos libres, así como en la actividad de la enzima deshidrogenasa láctica, citocromo oxidasa, proteasa, aspartato amino transaminasa, entre otras; observado en el nervio hepatopancreático y en los tejidos relacionados a la ovotestis del caracol *Lymnaea acuminata*; luego de 7 días post tratamiento el caracol se logra recuperar de estas alteraciones volviendo a sus parámetros normales (Tiwari & Singh 2005).

Mello-silva et al. (2011) analizaron el contenido de proteínas totales y la degradación del nitrógeno dentro del caracol *Biomphalaria glabrata*, infectado con *Schistosoma mansoni* y expuesto al látex de la *Euphorbia splendens*, en dosis de 1mg/l por espacio de 24 horas, observándose como resultados la alteración en las concentraciones de ácido úrico, urea y proteínas totales, traducidas en un agotamiento de las fuentes de energía (proteínas totales) y una significativa variación en la degradación de productos nitrogenados; incrementándose los niveles de urea, pero disminuyendo el nivel de ácido úrico, resultado que se refleja en la alteración del metabolismo del caracol, ocasionando la muerte de éste, por intoxicación con el látex.

Las fracciones molusquicidas (proteica) de la *Euphorbia*, son denominadas Milliamines, eumillins o milins, de las cuales en 1993, se lograron aislar 8 milliamines, de los que 3 eran conocidos e identificados por las letras A, D, y E; mientras que los cinco restantes fueron compuestos nuevos, de lo que se encontró que el L, también tiene efecto molusquicida en concentraciones de 2,5 ug l<sup>-1</sup> (Zani et al. 1993), posteriormente Santos et al. (2007) evaluaron la acción de la fracción triterpénica e irritante de la *Euphorbia conspicua*, encontrando que tiene una alta actividad contra los *Biomphalaria glabrata* en su forma adulta; y posteriormente Mata et al. (2011), fraccionaron el látex en dos partes, una molusquicida y la otra de triterpénicos irritantes I y II, de donde se aisló el 20-O-acetil-3-O-angeloylingenol, evaluándose su efecto molusquicida, observándose que actúa de forma muy similar a la niclosamida (molusquicida sintético),

comprobando de esta manera que también tiene efecto molusquicida la fracción irritante de la *Euphorbia conspicua*.

Por otra parte un estudio realizado con el látex de la *Euphorbia royleana*, ha arrojado que la fracción obtenida a través del benceno: “Etil acetato” (5:5) tiene su máxima actividad molusquicida contra el *Lymnaea acuminata*, en dosis que varían de acuerdo al tiempo de exposición, teniendo que en exposiciones de 24 horas, la dosis letal es de 14,28 mg/l; mientras que en exposiciones de 96 horas la dosis letal baja a 9,28 mg/l (Tiwari et al. 2004).

En trabajos más recientes se ha evaluado la actividad proteolítica del látex (S. Yadav et al. 2006), logrando aislar de la fracción proteica del látex de algunas de las especies de la familia de las *Euphorbiaceae*, enzimas del tipo serine proteasas, con una actividad proteolítica estable en un rango de pH entre 5 y 12 (Yadav et al. 2011; Yadav et al. 2012).

Es importante hacer mención que de acuerdo al trabajo realizados por Oliveira-Filho & Paumgarten (1997); el látex de la *Euphorbia splendens* pierde su capacidad molusquicida por efecto de la luz, en otras palabras es fotodegradable; ellos encontraron que el látex pierde su actividad molusquicida después de 96 horas (4 días) de exposición a la luz; pero, si se mantiene bajo temperatura ambiente y protegido de la luz, puede mantener su actividad molusquicida por espacio de 9 días máximo, para posteriormente ir perdiéndola gradualmente hasta el 23avo día, donde no hay poder molusquicida; mientras que si se mantiene en condiciones de refrigeración (-4°C), y protegido de la luz puede mantenerse estable su actividad molusquicida, por un largo periodo (un año aproximadamente).

A pesar de ser sensible a la fotodegradación, aún se tiene presente que el látex de la *Euphorbia splendens*, puede ser muy útil en el control de los caracoles pulmonados (Afonso-neto et al. 2010), dentro de los que se tiene a los lymneidos.

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

Esta es una investigación básica, experimental y de nivel explicativo; porque se busca entender el efecto del látex de la *Euphorbia splendens* sobre el metabolismo proteico de los caracoles lymneidos. Éste estudio podría servir de base para el establecimiento de un posible control biológico de la *Fasciola hepatica* a nivel del hospedero intermediario que son caracoles del género *Lymnaea*.

#### 2. LOCALIZACIÓN

La presente investigación se llevó a cabo en la ciudad de Cajamarca, la cual se encuentra ubicada a 7° 9' 8" de latitud sur y 78° 29' 29" de longitud oeste, con una altitud de 2678 m. s. n. m., de acuerdo a los datos reportados por la estación meteorológica de la Universidad Nacional de Cajamarca –SENAMHI.

Así mismo cuenta con un clima seco, templado, soleado por el día y frío en la noche; teniendo las siguientes características meteorológicas:

- Temperatura ambiental(\*):
  - Temperatura máxima : 21,13°C
  - Temperatura mínima : 08,39°C
  - Temperatura promedio : 14,08 °C
- Humedad relativa (\*):
  - Humedad máxima : 80,1%
  - Humedad mínima : 40,8%
  - Humedad promedio : 69,03%
- Precipitación pluvial anual (\*): 585 ml
- Presión atmosférica(\*) : 742,36 mb

(\*) Estos datos han sido obtenidos de la página web del SENAMHI, de los meses de enero 2013 a febrero 2014.

### **3. UNIDAD DE ANÁLISIS, POBLACIÓN Y MUESTRA**

#### **3.1 Unidad de Análisis:**

La unidad de análisis del presente trabajo fueron los caracoles del género *Lymnaea sp.*, hospedero intermediario de la *Fasciola hepatica*.

#### **3.2 Población:**

La población del presente trabajo fueron los caracoles del género *Lymnaea sp.* que han sido producidos bajo condiciones de laboratorio.

#### **3.3 Muestra:**

Para la selección de la muestra se tuvo en cuenta los siguientes criterios de exclusión o inclusión:

- Caracoles que midan entre 4 a 6 mm de longitud.
- Caracoles que pertenezcan a la primera generación, de caracoles producidos en laboratorio.
- Que sean caracoles que muestren mayor vitalidad, es decir que mantengan el color negruzco que los caracteriza, humedad en su concha, presenten movimiento y respondan a estímulos.

La muestra del presente estudio estuvo compuesta por 20 caracoles para cada tratamiento más dos grupos control, teniendo un total de 480 caracoles; adicionalmente se contó con 165 caracoles, para determinar la dosis letal del látex de la *Euphorbia splendens*.

### **4. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

La investigación presenta un diseño experimental con arreglo de tratamientos, sobre la base del tratamiento con látex de *Euphorbia splendens* en diferentes concentraciones y la condición de infección de los caracoles con *Fasciola hepatica*. El diseño se detalla más adelante.

## METODOLOGÍA:

### 4.1 Obtención y distribución de los caracoles *Lymnaea sp*

**Recolección de caracoles:** inicialmente se recolectó caracoles del género *Lymnaea sp.* de los alrededores de los canales de riego que existen en las zonas de Otuzco y Tartar, e instalaciones de la Estación Experimental Baños del Inca- INIA (Fig. 1), provincia de Cajamarca; y del distrito de Sorochuco, provincia de Celendín; en frascos de boca ancha y con tapa, que permitió su adecuado traslado al laboratorio.



**Figura 1:** Caracoles *Lymnaea sp.* presentes en acequia de la E.E.B.I. - INIA

**Propagación de caracoles:** los caracoles recolectados fueron mantenidos en tapers descartables con lodo (elaborado de arena previamente esterilizada y agua de clorada), y alimentados con lechuga *ad libitum*, y con fuente de calor por espacio de 8 horas al día (Fig. 2); a fin de que se produzca la ovoposición y por ende su reproducción, obteniéndose de esta manera la generación F1, especímenes que fueron la población y muestra del presente trabajo. Asegurando de esta forma que los caracoles se encontraban libres de *Fasciola hepatica*.



**Figura 2:** Cultivo de caracoles *Lymanea sp.* en condiciones de laboratorio

Los caracoles colocaron sus masas de huevos en las paredes de los tapers, sobre sus caparazones y sobre el sustrato de lodo, una vez que se observó la presencia de las masas, se procedió a retirar los caracoles padres del taper y ubicarlos en otro taper para que continúen con la ovoposición, así mismo se identificó el taper, para llevar el registro de ovoposición y tener en cuenta la fecha probable de la eclosión, para de esta manera revisar los tapers y agregar el alimento respectivo.

La incubación de los huevos fue de 8 a 11 días bajo condiciones de laboratorio. Cuando se obtuvo los caracoles recién nacidos, se les colocó lechuga fresca picada, para su alimentación, no se cambió de sustrato, hasta que hayan obtenido un tamaño mayor a 2 mm.

**Infección de caracoles:** este procedimiento solo se realizó a la mitad de la población de caracoles producidos en laboratorio; para lo cual, una vez obtenidos los caracoles F1, se seleccionó los caracoles que median aproximadamente 4 mm, para infectarlos con el miracidio de *Fasciola hepatica*; el procedimiento de obtención de esta larva se describe en el acápite 4.2 de éste capítulo.

Para la infección de los caracoles, se colocaron éstos en celdas individuales, en una placa de ELISA, de 96 pozos. En cada pozo se depositó un miracidio, 1 ml de agua dechlorada, y un caracol del género *Lymnaea sp.* por espacio de 6 horas (Salazar et al. 2006), a fin de asegurar la infección del caracol por el miracidio.

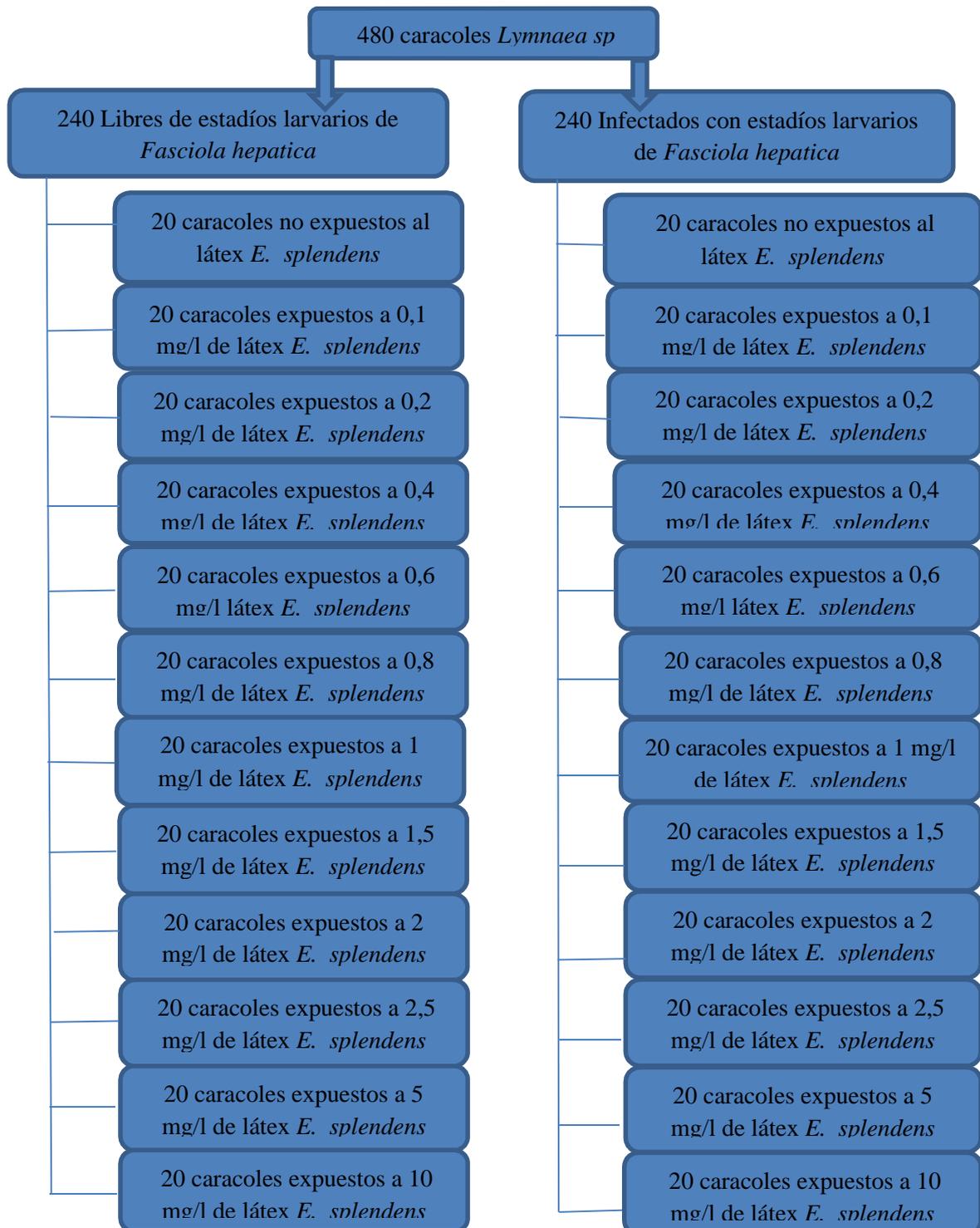


**Figura 3:** Caracoles *Lymnaea sp.* expuestos al miracidio de *Fasciola hepatica*

Después de las 6 horas de exposición al miracidio, se corroboró que los caracoles se hayan infectado, observando en el estereoscopio la presencia del miracidio. Posteriormente los caracoles infectados fueron distribuidos en los doce tratamientos del experimento, y mantenidos como se mencionó en el ítem anterior, hasta que fueron expuestos al látex.

Para volver a corroborar la infección del caracol con *Fasciola hepatica* se procedió a apretar un caracol entre dos láminas porta objetos y se observó al estereomicroscopio a fin de buscar redias, lo que nos aseguró la infección con *Fasciola hepatica*. Este procedimiento se hizo a las 2 semanas post infección con el miracidio de *Fasciola hepatica*, porque de esta manera nos aseguramos de que los caracoles sobrevivieron a la infección por *Fasciola hepatica*, y no sea un sesgo a la hora de evaluar el efecto del látex de la *Euphorbia splendens*.

**Distribución de los caracoles en los grupos experimentales:** cada tratamiento del experimento estuvo constituido por 20 caracoles del género *Lymnaea sp.*, mantenidos en un taper plástico con tapa, debidamente identificado. La distribución de los lymneidos en los diferentes tratamientos, se muestra en la figura 4:



**Figura 4:** Distribución de la población de lymneidos en los diferentes tratamientos

En resumen se tiene:

- Tratamiento control: dividido en dos grupos, constituido el primero por caracoles libres de estadíos larvarios de *Fasciola hepatica* y el segundo por caracoles infectados con estadíos larvarios de *Fasciola hepatica*; haciendo un total de 40 caracoles.
- Tratamientos del 1 al 11, donde cada tratamiento se dividió en 2 grupos; haciendo un total de 440 caracoles, de los cuales 220 son infectados y 220 están libres de estadíos larvarios de *Fasciola hepatica*.

**Mantenimiento de los caracoles *Lymnaea sp.*:** el mantenimiento de los caracoles se hizo en tapers, que contenían, lodo preparado con arena de río estéril más agua declorada (Fig. 5); bajo condiciones de 8 horas de luz artificial por día en promedio, para su alimentación se proporcionó hojas de lechuga previamente lavadas con agua declorada a chorro y luego secadas con papel absorbente, a fin de retirar residuos agro tóxicos y otros parásitos que puedan alterar el experimento. La alimentación se proporciona 3 veces por semana (Salazar et al. 2006).



**Figura 5:** Taper con lodo preparado para mantener a los caracoles

#### **4.2 Obtención de miracidios para la infección de los caracoles *Lymnaea sp.***

Para la obtención de los miracidios se incubó huevos de *Fasciola hepatica* bajo condiciones de laboratorio.

Los huevos a incubar se obtuvieron de la vesícula biliar y canalículos biliares de bovino, sacrificados en el camal municipal de Cajamarca. Estos huevos fueron recolectados en frascos de vidrio de boca ancha, de preferencia, y con tapa, para ser conducidos al laboratorio en donde fueron lavados con agua declorada a fin de retirar los residuos de bilis y otros detritos que puedan tener; posteriormente fueron incubados a una temperatura promedio de 22 °C por 14 días aproximadamente, momento en que se espera que emerja el miracidio, previamente se estimuló colocando los huevos incubados en placas petri que se expusieron a la luz (Andrews 1999).

Una vez que se obtuvieron los miracidios, estos fueron confrontados con los caracoles, en pozos, para la infección respectiva, siguiendo la metodología descrita en el acápite de Infección de los caracoles.

#### **4.3 Propagación de la *Euphorbia splendens*:**

Para la propagación de la *Euphorbia splendens* (Fig. 6), se siguió los siguientes pasos (Martínez 2005):

- Se seleccionó una planta madre de los jardines ornamentales de la ciudad de Cajamarca, para lo cual se tuvo en cuenta lo siguiente:
  - ✓ Edad mayor a 2 años.
  - ✓ Estar bien conformada, es decir vigorosa (color verduzco de sus hojas, con tallos fuertes).
  - ✓ Presentar hojas sanas.
  - ✓ Estar libre de plagas y enfermedades
- Una vez seleccionada la planta madre, se procedió a ubicar la parte central de la misma, para seleccionar de esta zona la mejor rama para la propagación.
- Esta rama fue cortada con una tijera de podar previamente desinfectada con agua jabonosa.
- La rama cortada fue dividida nuevamente en tres regiones: apical, media y basal.

- De la región media, se extrae la estaca, que no es más que un pedazo de la rama de un tamaño de 10 cm, esta porción contó con un mínimo de 2 yemas vegetativas. El corte a nivel basal, es de forma horizontal, mientras que el corte a nivel apical es en forma de bisel pero en oposición a la yema.
- Previo a este proceso se preparó el sustrato donde se propagó la planta, el cual fue a base de arena de río lavada y desinfectada; ubicada en bandejas de plástico, con una profundidad de 10 cm, previamente perforadas.
- En el sustrato se enterró la tercera parte de la estaca y se dejó por 45 días, tiempo en que formó el callo y la raíz, momento en el cual se procedió a trasplantar en un macetero con sustrato adecuado (tierra agrícola y fertilizante) para su cultivo permanente.
- A partir de los 8 meses de vida de la planta, se puede obtener el látex respectivo.



**Figura 6:** *Euphorbia splendens*

#### **4.4 Obtención del látex y preparación de las concentraciones:**

En el presente trabajo se trabajó con el látex crudo de la *Euphorbia splendens* o Corona de Cristo.

**Obtención del látex:** para este caso se realizó cortes transversales y/o a 45° del eje central de la planta, y a 10 cm por debajo del meristema apical de cada rama de la *Euphorbia splendens* (se buscó siempre las ramas más fuertes). El látex fue recolectado en un frasco estéril de boca ancha, con tapa rosca y forrado con papel aluminio, a fin de evitarse la coagulación y fotodegradación del látex (Vasconcellos & Amorim 2003; Oliveira-Filho & Paumgarten 1997), fue trasladado a las instalaciones del laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Cajamarca, donde se conservó en condiciones de refrigeración, hasta el momento de su utilización.

**Preparación de las concentraciones:** las concentraciones usadas en el presente trabajo fueron elaboradas a partir del látex obtenido de la planta; de acuerdo a lo referido en los trabajos de Mello-silva et al. (2006) y de Vasconcellos & Amorim (2003), preparando inicialmente una solución madre; de una proporción de 1 ml del látex natural en 1000 ml de agua destilada; logrando de esta manera una concentración de 1000 mg/litro (Vasconcellos & Amorim 2003) y fue refrigerado a una temperatura entre 0 y 4°C hasta su uso, además la solución fue protegida con papel aluminio, para evitar su fotodegradación.

Posteriormente se procedió a realizar las diluciones respectivas a partir de la solución madre; referidas por Vasconcellos & Amorim (2003); para obtener la primera dilución se extrajo 0,1 ml de la solución madre y se depositó en un recipiente con 1 litro de agua destilada, logrando una concentración de 0,1 mg/l.

Las concentraciones usadas fueron: 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 5,0 y 10 mg/l; que además son concentraciones establecidas por la Organización Mundial de la Salud, cuando se trabaja con plantas para probar efectos molusquicidas (Mello-silva et al. 2006; Vasconcellos & Amorim 2003).

#### 4.5 Exposición de los *Lymnaea sp* al látex de la *Euphorbia splendens*

Los *Lymnaea sp.* antes de ser expuestos al látex de la *Euphorbia splendens*, en las diferentes concentraciones, fueron lavados con agua destilada a fin de retirar residuos de su habitat de lodo que puedan interferir con el ensayo; posteriormente fueron colocados en placas Petri debidamente rotuladas con el tratamiento respectivo, con la solución del látex previamente preparado, se los tapó y se registró la hora del inicio de la exposición a fin de controlar un periodo de 24 horas (Fig. 7).



**Figura 7:** Exposición de Lymneidos al látex en las diferentes concentraciones

#### 4.6 Evaluación de la alteración del metabolismo proteico del caracol *Lymnaea sp*:

Para la evaluación de la alteración del metabolismo proteico, se esperó que pase las 24 horas de exposición al látex; luego los caracoles fueron lavados con agua declorada a chorro y con agua destilada, para retirar los residuos del látex, y recién se procedió a extraer el fluido corporal de éstos, para proceder posteriormente a realizar los análisis respectivos.

**Extracción de fluido corporal del caracol:** para extraer el fluido corporal de los caracoles expuestos previamente al látex, previamente se realizó varios pilotos, logrando establecer el siguiente protocolo:

- Se tomó 5 caracoles del tratamiento a evaluar, se los lavó con agua destilada, por 3 oportunidades, a fin de retirar los restos de lodo y desechos que pueden haber en su cuerpo.
- Se los dejó secar sobre un pedazo de papel absorbente, por espacio de 10 minutos.



**Figura 8:** Caracoles secándose, sobre papel absorbente

- En un microtubo, debidamente rotulado con el código de tratamiento que le corresponde y número de evaluación; se coloca 20 ul de agua destilada.
- Se procedió a colocar dentro de los microtubos con agua destilada a los 5 caracoles previamente secados, y se los trituró con la ayuda de un estilete.
- Una vez triturados, se tiene una masa uniforme, se lleva al agitador por espacio de 10 segundos aproximadamente.
- Luego se centrifugó a una temperatura de 15°C, a 15 000 rpm, por un tiempo de 30 minutos.
- Finalmente con la ayuda de una micropipeta, se retiró el fluido corporal separado de la parte sólida del caracol; y se depositó en un microvial de 50 ul, debidamente identificado.
- Se refrigeró a -20°C hasta que fue utilizado para determinar proteínas totales, así como ácido úrico y urea.



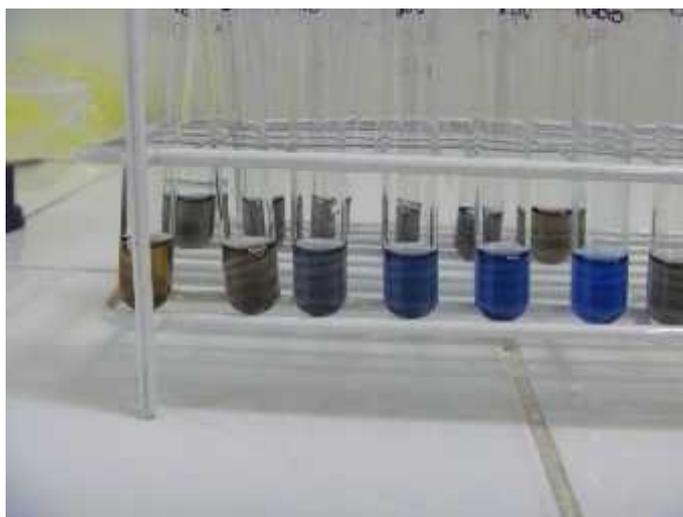
**Figura 9:** Fluido corporal de los caracoles separados del material sólido

**Proteínas totales:** para evaluar este parámetro se usó la técnica de Bradford; para lo cual, se procedió a realizar varios ensayos previos, a fin de obtener la cantidad óptima de muestra y dilución necesaria para la puesta a punto de la técnica.

Antes de iniciar la evaluación de proteínas totales de los fluidos corporales de los caracoles, se procede a elaborar la curva de calibración de acuerdo a lo detallado en el anexo 2.

El procedimiento para la determinación de proteínas en los fluidos corporales de los caracoles *Lymnaea sp.* fue el siguiente:

- De los fluidos corporales del caracol, se extrajo 10 ul y se diluyó en 40 ul de agua destilada, a fin de obtener una dilución de 1:5
- De esta dilución inicial se tomó 10 ul y se diluyó en 90 ul de agua, obteniendo una dilución de 1:100
- Se etiquetó los tubos de ensayo de 5 ml, con los tratamientos respectivos.
- Se agregó 1 ml de reactivo Bradford a cada tubo de ensayo
- Posteriormente se agregó 20 ul de muestra
- Se agitó
- Se lee en el espectrofotómetro, con absorbancia de 465 a 595 nm
- Los datos obtenidos se compara con los de la curva de calibración a fin de ubicarlos dentro de la curva



**Figura 10:** Evaluación de proteínas totales con la técnica de Bradford

**Ácido úrico y urea:** la evaluación de estos parámetros se hizo en el laboratorio de Diagnóstico Clínico de la Clínica Limatambo; utilizando el equipo automatizado COBAS C111 (Fig. 11); empleando los siguientes kits:

- UREAL Roche diagnóstico: para determinar urea.
- AU2 Roche diagnóstico: para determinar ácido úrico.

El procedimiento seguido fue:

- Se calibró la máquina para las lecturas de ácido úrico y urea, con los reactivos correspondientes.
- La dilución de 1:5 sobrantes de los fluidos corporales de los caracoles *Lymnaea sp.*, se colocó en la cubeta respectiva de muestra; y se inició las pruebas.



**Figura 11:** Equipo Cobas C111

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 1:** Concentración de los Parámetros evaluados en los fluidos corporales de los caracoles *Lymnaea sp.*, libres de estadios larvarios de *Fasciola hepatica*; 24 horas post exposición al látex de *Euphorbia splendens*

Tratamiento	N° caracoles <i>Lymnaea sp.</i>	Concentración látex (mg/l)	Promedios de parámetros evaluados		
			Proteína (mg/ml)	Ácido úrico (mg/dl)	Urea (mg/dl)
Control	15	0	14,76	0,6	49,75
1	15	0,1	20,48	0,32	40,10
2	15	0,2	20,79	0,4	31,45
3	15	0,4	22,45	0,29	32,47
4	15	0,6	27,77	0,27	41,92
5	15	0,8	30,03	0,15	37,65
6	15	1,0	31,75	0,18	39,33
7	15	1,5	35,97	0,13	31,23
8	15	2,0	37,97	0,13	33,10
9	15	2,5	41,52	0,1	30,57
10	15	5,0	45,87	0,1	22,18
11	15	10,0	50,29	0,1	19,64

En la Tabla 1, nos muestra el incremento de las concentraciones de proteína total dentro de los fluidos corporales de los caracoles *Lymnaea sp.*, cuando son expuestos a las diferentes concentraciones del látex de la *Euphorbia splendens*; se colige de estos resultados una correlación positiva, donde a mayor concentración de látex, mayor

concentración de proteína dentro de los fluidos corporales de los caracoles *Lymnaea sp.*, lo cual se ve reforzado por las observaciones que se tiene de los productos nitrogenados: urea y ácido úrico, que para el caso de los lymneidos no infectados con *Fasciola hepatica* va a disminuir sus concentraciones; indicando de esta manera; una alteración del metabolismo de las proteínas dentro del caracol, lo cual conlleva a una intoxicación y muerte del mismo.

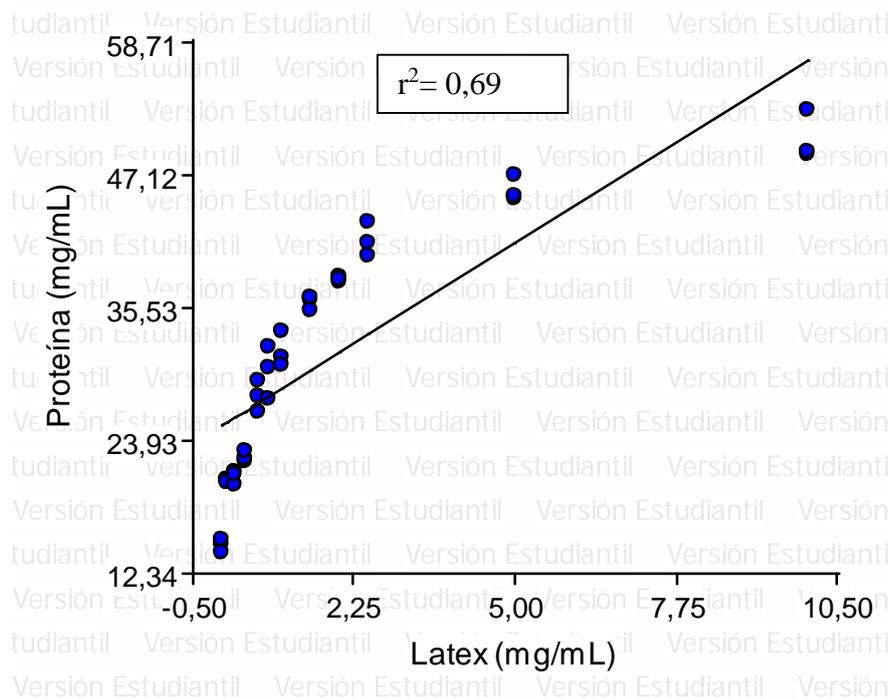
**Tabla 2:** Diferencias entre el grupo control y las diferentes concentraciones del látex de la *Euphorbia splendens* – prueba de Tukey

Tratamiento	Concentración del Látex mg/l	Promedio de proteínas totales mg/ml	Prueba de Tukey
Control	0	14,76	A
1	0,1	20,48	B
2	0,2	20,79	B
3	0,4	22,45	B
4	0,6	27,77	C
5	0,8	30,03	C – D
6	1,0	31,75	D
7	1,5	35,97	E
8	2,0	37,97	E – F
9	2,5	41,52	F
10	5,0	45,87	G
11	10,0	50,29	H

(Prueba de Tukey, p 0,0001, donde letras diferentes indican diferencia significativa)

Antes de analizar la tabla 2, es importante indicar que previo a la aplicación de la prueba de Tukey, se realizó el análisis de varianza para establecer la diferencia significativa entre los diferentes tratamientos y el control.

En la Tabla 2 observamos que existe diferencias significativas entre el grupo control y las diferentes concentraciones de látex, en lo que se refiere al incremento de las concentraciones de proteínas totales, entre uno y otro tratamiento; al encontrar letras diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey.



**Figura 12:** Relación de la concentración de proteínas totales en los caracoles *Lymnaea sp.*, con las concentraciones de látex de la *Euphorbia splendens* a los que fueron expuestos

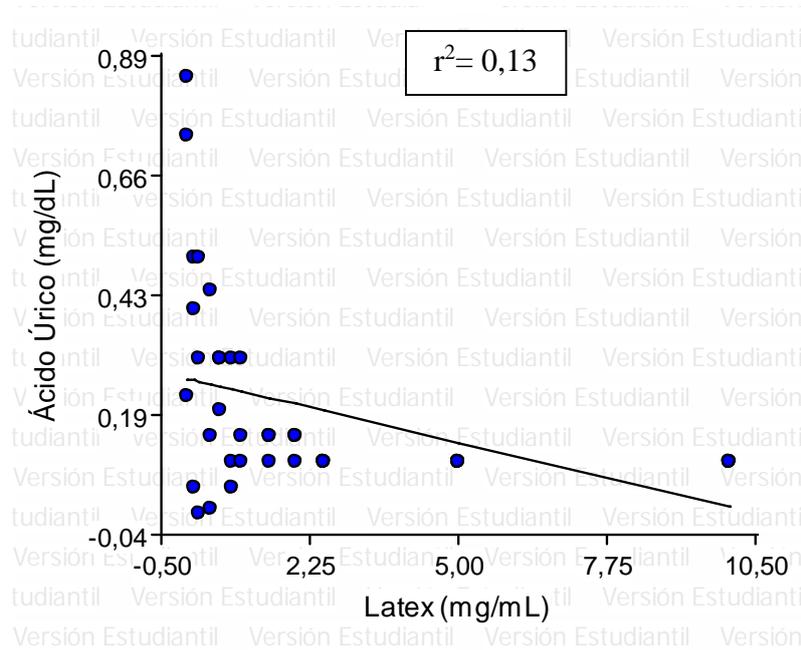
En la Figura 12, se muestra la tendencia de la correlación positiva que existe entre las concentraciones del látex e incremento de las concentraciones de proteínas totales en los lymneidos evaluados, teniendo un coeficiente de regresión de 0,69.

De acuerdo a los resultados mostrados en las Tablas 1, 2 y Figura 12; en relación a los niveles de concentración de proteínas totales dentro de los fluidos corporales de los caracoles *Lymnaea sp.* no infectados con estadíos larvarios de *Fasciola hepatica*, se aprecia claramente la relación que se da, entre la exposición de los caracoles al látex de

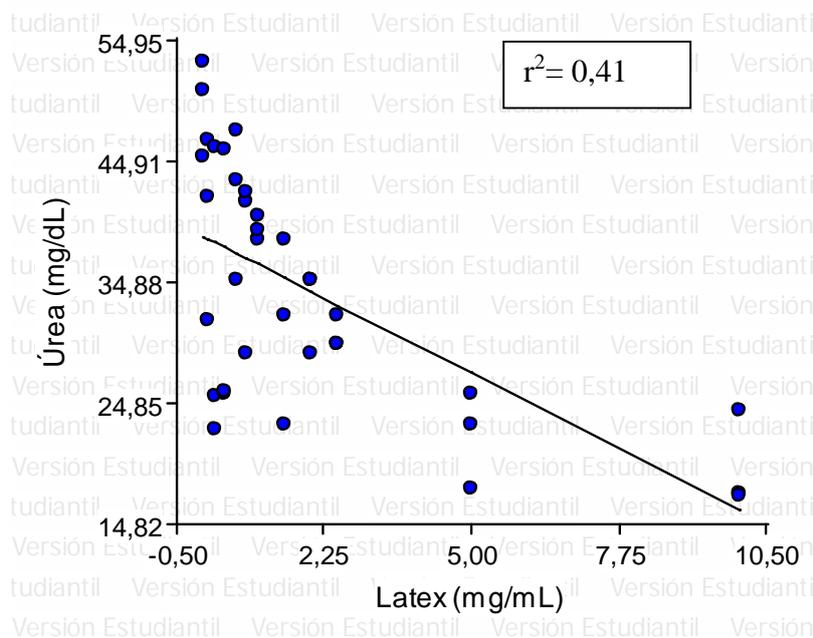
la *Euphorbia splendens*; a mayor concentración de látex, mayor concentración de proteínas totales, lo que demuestra que se produce una alteración en el metabolismo de las proteínas, esto posiblemente se debió a que uno de los mecanismos del látex es producir necrosis a nivel de la glándula digestiva y otros órganos del caracol (Pile et al. 1998; Araújo et al. 2002), esto indica que se genera un daño celular y por ende lisis de las mismas, liberando proteínas (Mello-silva et al. 2006); lo cual se traduce en un incremento del metabolismo proteico, ocasionando principalmente una respuesta por parte del caracol para mantener la homeostasis a través de la transaminación que a su vez conlleva a la liberación de aminoácidos, los que tienen que ver con la generación de energía (Singh et al. 2005; Tiwari et al. 2004). Por otra parte, Tiwari & Singh (2005) observaron alteraciones en el metabolismo de las proteínas totales, aminoácidos libres, actividad enzimática (citocromo oxidasa) en el tejido nervioso, hepatopáncreas y sistema reproductivo del *Lymnaea acuminata*, al exponerlo al látex de la *Euphorbia tirucalli*; y del mismo modo Yadav et al. (2006), al evaluar la *Croton tiglium* (*Euphorbiaceae*), indican que se producen alteraciones del metabolismo de las proteínas, carbohidratos, enzimas entre otros a nivel del tejido nervioso y del hepatopáncreas del *Lymnaea acuminata*; mientras que Mello-silva et al. (2011) y Lima et al. (2012), trabajaron probando el efecto del látex de la *Euphorbia splendens* sobre los *Biomphalaria glabrata*, demostrando que existe la tendencia, en el primer día post infección, a incrementar el nivel de proteínas totales en el caracol no infectado; lo que corrobora los resultados obtenidos en relación con el nivel de proteínas en los fluidos corporales de los lymneidos existentes en Cajamarca, que son similares a los observados en *Biomphalaria glabrata*; es importante indicar que la información de los investigadores mencionados líneas arriba que trabajaron con el género *Lymnaea*, son a nivel de tejidos y de hemolinfa.

En relación con la información obtenida sobre los compuestos nitrogenados evaluados en los fluidos corporales de los caracoles *Lymnaea sp.*, como son el ácido úrico y la urea, la Tabla 1, nos muestra una relación negativa, debido a que se observa una disminución de ambos compuestos a medida que se incrementa la concentración del látex de la *Euphorbia splendens*, pero al análisis estadístico con la prueba de Tukey, existe diferencia significativa entre el grupo control y el tratamiento sometido a una dosis de 2,5 mg/l de látex de la *Euphorbia splendens*, para el caso del ácido úrico; mientras que para el caso de la urea, hay diferencia significativa a partir del tratamiento

sometido a una dosis de 5 mg/l (anexo 5). En la Tabla 1, también observamos que existe una menor concentración de urea en todos los caracoles.



**Figura 13:** Relación de las concentraciones del látex de *Euphorbia splendens* y concentración de ácido úrico en los lymneidos.



**Figura 14:** Relación de las concentraciones del látex de *Euphorbia splendens* y concentración de urea en los lymneidos.

Las figuras 13 y 14, nos ilustran mejor la correlación negativa que se da entre las concentraciones de ácido úrico y urea con respecto a las concentraciones del látex de la *Euphorbia splendens* al que fueron expuestos los caracoles, teniendo que a mayor concentración de látex, menor presencia de ácido úrico en los fluidos del caracol.

Se conoce que los caracoles del género *Lymanea* son uricotélicos, es decir elimina los desechos nitrogenados de su organismo a través del ácido úrico principalmente, en casos de estrés el nivel de ácido úrico disminuye, lo cual conlleva a que se acelere el ciclo de la urea, incrementando o tratando de mantener los niveles de este sub producto en la hemolinfa, debido a que esta forma de degradación de los compuestos nitrogenados es menos nocivo para el caracol, alterando el patrón normal de formación de ácido úrico (Mello-silva et al. 2006; Mello-silva et al. 2011; Lima et al. 2012), esto se debe principalmente a los procesos de adaptación del caracol al factor de estrés que para el presente estudio fueron las concentraciones de látex; lo que explica el por qué en los resultados obtenidos se observa claramente una disminución del ácido úrico en los fluidos corporales del caracol *Lymnaea sp.*, más no así en los niveles de urea; lo que permite afirmar que el látex de la *Euphorbia splendens* ocasiona una alteración a nivel del metabolismo proteico de los caracoles, lo cual conlleva a una intoxicación y que, dependiendo de la dosis de concentración del látex, produce la muerte del lymneido.

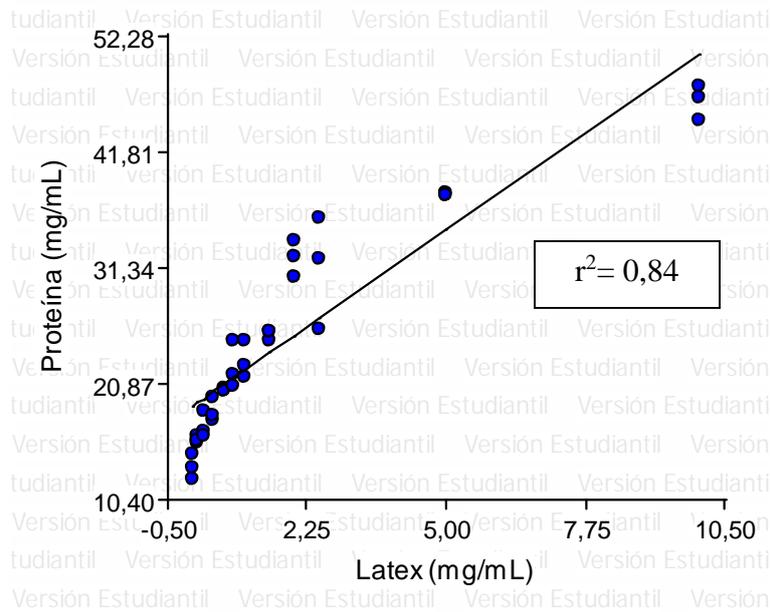
**Tabla 3:** Concentración de los parámetros evaluados en los fluidos corporales de los caracoles *Lymnaea sp.* infectados con estadíos larvarios de *Fasciola hepatica*, 24 horas post exposición al látex de *Euphorbia splendens*

Tratamiento	N° caracoles <i>Lymnaea sp.</i>	Concentración látex (mg/l)	Promedios de parámetros evaluados		
			Proteína (mg/ml)	Ácido úrico (mg/dl)	Urea (mg/dl)
Control	15	0	13,33	1,58	13,50
1	15	0,1	15,82	1,35	11,25
2	15	0,2	17,02	1,20	6,98
3	15	0,4	18,39	1,42	11,83
4	15	0,6	20,31	1,25	8,45
5	15	0,8	22,37	1,55	8,67
6	15	1,0	22,96	1,42	8,83
7	15	1,5	25,36	2,40	11,50
8	15	2,0	32,18	0,95	11,28
9	15	2,5	31,22	0,83	8,82
10	15	5,0	38,01	1,30	13,95
11	15	10,0	46,37	1,32	12,67

(Diferencias significativas P 0,0001; prueba de Tukey)

En la Tabla 3, se puede observar de manera general el comportamiento de los lymneidos infectados con estadíos larvarios de *Fasciola hepatica* en relación con la exposición a las diferentes concentraciones del látex de la *Euphorbia splendens*, donde se puede indicar que al igual que en la población de caracoles no infectados, también se incrementa las concentraciones de las proteínas totales a medida que se incrementa la concentración del látex; de acuerdo a la prueba de Tukey (Tabla 12 del anexo 5), se

tiene que existe diferencias significativas entre el grupo control y los tratamientos a partir de 0,6 mg/l de concentración del látex, para los caracoles infectados, así mismo se observa diferencias significativas de éste tratamiento con los tratamientos de 2,5; 5 y 10 mg/l de concentración de látex de *Euphorbia splendens*.



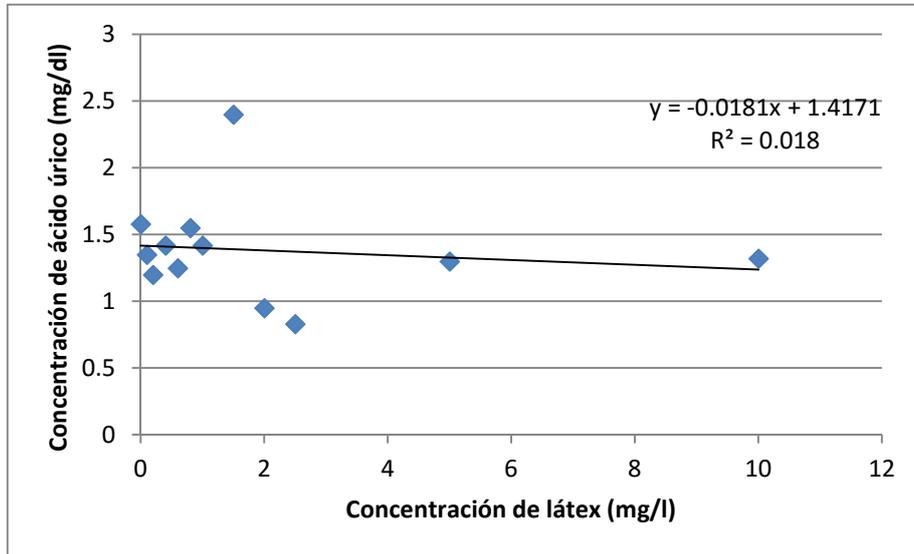
**Figura 15:** Relación entre la concentración del látex de *Euphorbia splendens* y concentración de proteínas totales en los lymneidos infectados con estadíos larvarios de *Fasciola hepatica*.

En el análisis de regresión (figura 15), se observa que el coeficiente obtenido es de 0,84; lo que nos demuestra que hay una correlación positiva entre el incremento de las concentraciones del látex y el nivel de proteínas totales, al igual que en la población de caracoles no infectados; y que como consecuencia de ello se están produciendo intoxicación de los caracoles; lo cual provoca la muerte de los mismos, de acuerdo a la concentración del látex usado.

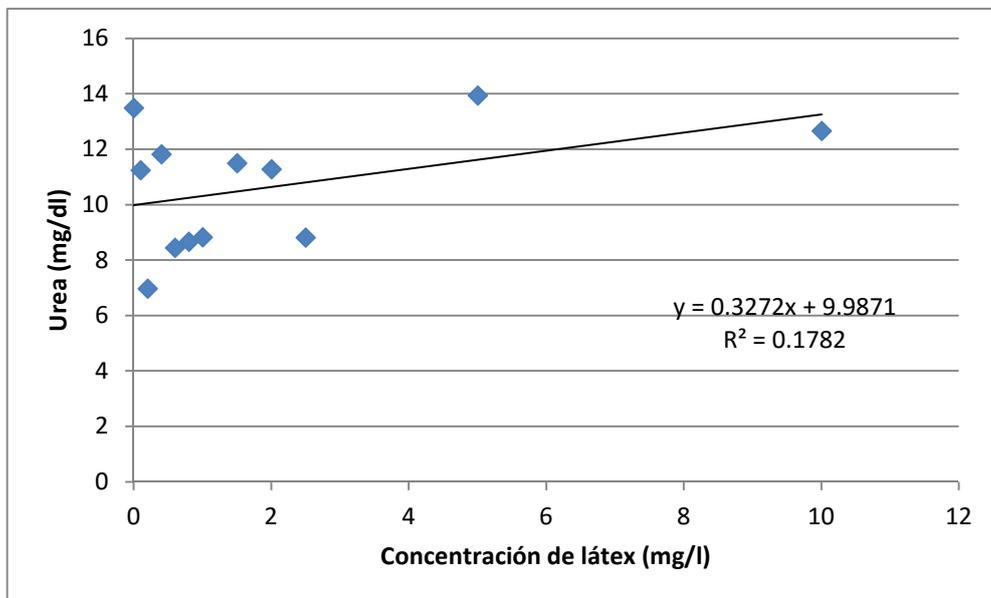
La información recolectada sobre los niveles de ácido úrico y urea, nos permite observar una disminución, para luego observar un incremento de los niveles de ácido úrico, en los fluidos corporales de los caracoles; lo que nos demuestra la alteración del metabolismo de las proteínas en los lymneidos evaluados.

Por otra parte las figuras 16 y 17, nos muestran la tendencia de la curva de correlación que existe entre la concentración del látex y los niveles de ácido úrico y urea

en los caracoles, demostrando de esta manera que los lymneidos se encuentran alterando el metabolismo de las proteínas, tratando de mantener una concentración constante del ácido úrico, con un ligero incremento de los niveles de urea, esto con la finalidad que el caracol pueda adaptarse al stress producto de su exposición al látex.



**Figura 16:** Relación entre los niveles de Concentración de látex y concentración de ácido úrico en los fluidos del caracol *Lymnaea sp* infectados con estadios larvarios de *Fasciola hepatica*



**Figura 17:** Relación entre la concentración de urea y concentración del látex en los fluidos corporales del caracol *Lymnaea sp.* infectados con estadios larvarios de *Fasciola hepatica*

Para el caso de los *Lymnaea sp.* infectados con estadíos larvarios de *Fasciola hepatica*, se tiene que han sufrido dos periodos de estrés: uno, durante la infección con el miracidio y el otro, con la exposición a las diferentes concentraciones del látex. La infección con el miracidio ha ocasionado que los caracoles alteren su metabolismo energético, requiriendo mayor cantidad de energía, además a nivel de la glándula digestiva se produce una reducción de los niveles de carbohidratos (Pinheiro et al. 2009), así como la lisis de las células de la glándula, y por otra parte el parásito ocasiona obstrucción de ductos, impidiendo la salida de la hemolinfa hacia los riñones causando toxicidad, lo que se acumula con los desechos del parásito, produciendo alteraciones en el metabolismo de los caracoles (Sokolina et al. 2012); sumado a estas alteraciones que se producen por efecto del látex, hacen que los caracoles traten de mantener la homeostasis, para lo cual se acelera el metabolismo energético, requiriendo nuevos caminos para producir glucosa, siendo uno de ellos el metabolismo de las proteínas, por lo cual, en el inicio de la exposición se produce un incremento del nivel de proteínas totales, para luego a medida que el tiempo pasa se produce un descenso (Lima et al. 2012; Pinheiro et al. 2009; Mello-silva et al. 2011; Tiwari et al. 2004); estas alteraciones, como ya se mencionó en el caso de los caracoles no infectados, están ocasionado una intoxicación que va a conllevar a la muerte del mismo.

**Tabla 4:** Comparación de la concentración de proteínas totales en los lymneidos infectados y no infectados, expuestos a las diferentes concentraciones de látex

<b>Grupo</b>	<b>Concentración del látex de <i>Euphorbia splendens</i></b>	<b>Proteína (mg/ml) Caracoles Infectados con estadíos larvarios de <i>Fasciola hepatica</i></b>	<b>Proteína (mg/ml) Caracoles libres de estadíos larvarios de <i>Fasciola hepatica</i></b>
Control	0	13,33	14,76
1	0,1	15,82	20,48
2	0,2	17,02	20,79
3	0,4	18,39	22,45
4	0,6	20,31	27,77
5	0,8	22,37	30,03
6	1,0	22,96	31,75
7	1,5	25,36	35,97
8	2,0	32,18	37,97
9	2,5	31,22	41,52
10	5,0	38,01	45,87
11	10,0	46,37	50,29

(P < 0,0109; prueba de Wilcoxon)

Previo al análisis de la tabla 4, es importante mencionar que los datos obtenidos en cada variable evaluada por cada grupo, fueron sometidos a la prueba de Kolgomorov – Smirnov; a fin de determinar su distribución en la curva, resultando que son datos no paramétricos, razón por la cual se aplicó la prueba de Wilcoxon.

En la Tabla 4, observamos que los caracoles infectados con estadíos larvarios de *Fasciola hepatica* y expuestos al látex de la *Euphorbia splendens*, tuvieron menor

concentración de proteínas totales con respecto a los no infectados, estableciendo diferencia significativa entre una población y otra, de acuerdo a la prueba de Wilcoxon.

A nivel de los tratamientos control no se observa mayor diferencia en sus concentraciones proteicas promedio (1,43 mg de proteína/ml); por otra parte, los grupos tratados con concentraciones de látex de 1,5 y 2,5; son los que muestran mayor diferencia en las concentraciones proteicas: 10,6 y 10,3 mg/ml, respectivamente. Esto nos demuestra que también hay una alteración en el metabolismo de los caracoles por la presencia del látex y por la condición de estar infectados con estadíos larvarios de *Fasciola hepatica*.

**Tabla 5:** Medianas de parámetros evaluados en caracoles infectados con estadíos larvarios de *Fasciola hepatica* versus caracoles libres de estadíos larvarios de *Fasciola hepatica* y expuestos al látex de *Euphorbia splendens*

<b>Parámetros evaluados</b>	<b>N° Caracoles <i>Lymnaea sp</i></b>	<b>Caracoles infectados con estadíos larvarios de <i>F. h.</i></b>	<b>Caracoles libres de estadíos larvarios de <i>F. h.</i></b>	<b>Valor de p</b>
Proteína	180	25,28	31,64	0,0109
Ácido úrico	180	1,38	0,22	<0,0001
Urea	180	10,64	34,12	<0,0001

(Prueba de Wilcoxon)

La Tabla 5 corrobora la diferencia que existe entre los dos grupos de caracoles: infectados y libres de estadíos larvarios de *Fasciola hepatica*, donde al analizar los datos obtenidos en cada variable con la prueba de Wilcoxon, hay diferencia significativa ( $p < 0,0001$ ) entre los grupos de caracoles.

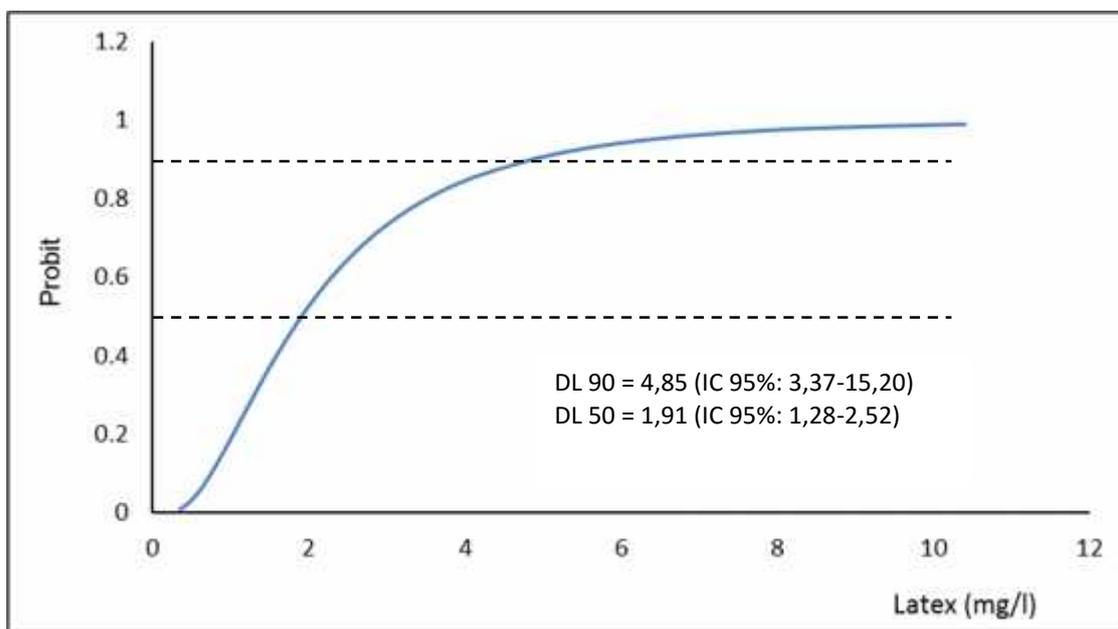
Con respecto a los resultados obtenidos sobre las concentraciones de proteínas totales en los caracoles infectados, éstas son menores a las concentraciones de los que se encuentran libres de estadíos larvarios de *Fasciola hepatica*, esto corrobora la información encontrada por Pinheiro et al. (2009), quienes encontraron una disminución de los niveles de proteínas a nivel de hemolinfa de los *Biomphalaria glabrata* infectados con *Schistosoma paraensei*; y de acuerdo a lo encontrado por Lima et al. (2012) y Mello-silva et al. (2011), el hecho de ser sometidos los caracol al estrés por la

infección con el miracidio, éstos sufren una alteración en el metabolismo energético, requiriendo mayores concentraciones de glucosa en sangre y adicionalmente a esto, el parásito en su traslado desde que ingresa a nivel de piel hasta el hepatopáncreas ocasiona la lisis de las células, siendo de mayor importancia la lisis a nivel de la glándula digestiva y del hepatopáncreas (Sokolina et al. 2012), este hecho ocasiona la liberación de proteína estructural de las células, la que es usada para mantener la homeostasis del caracol, así mismo se produce la liberación de arginina, aminoácido esencial para el desarrollo del parásito dentro del caracol, ocasionado en este caso niveles inferiores de proteína en los caracoles infectados que en los caracoles libres de estadíos larvarios de *Fasciola hepatica*.

**Tabla 6:** Número de caracoles *Lymnaea sp.* muertos después de haber sido expuestos al látex de *Euphorbia splendens*

Concentración del látex <i>Euphorbia splendens</i> (mg/l)	N° <i>Lymnaea sp</i> expuestos	N° muertos			Total de muertos	Porcentaje de Mortalidad
		Día1	Día 2	Día 3		
0,10	15	0	0	0	0	0
0,20	15	1	0	0	1	6,7
0,40	15	1	0	0	1	6,7
0,60	15	1	0	1	2	13,3
0,80	15	3	1	0	4	26,7
1,00	15	2	1	0	3	20,0
1,50	15	4	1	1	6	40,0
2,00	15	3	2	0	5	33,3
2,50	15	7	3	0	10	66,7
5,00	15	13	2	0	15	100,0
10,00	15	15	0	0	15	100,0

La Tabla 6, nos permite observar la mortalidad de los caracoles expuestos al látex de la *Euphorbia splendens* por 24 horas, donde a partir de las concentraciones superiores a 2,5 mg/l se produce el mayor porcentaje de mortalidad; y que al análisis estadístico de probabilidad, la dosis letal media, que se observa en la figura 18, es de 1,91 mg/l; mientras que la dosis letal 90, es de 4,85 mg/l.



**Figura 18:** Representación de dosis letal media y dosis letal 90, del látex de la *Euphorbia splendens*, sobre caracoles *Lymnaea sp.*

Los resultados mostrados nos permiten deducir la actividad molusquicida del látex de la *Euphorbia splendens* sobre los lymneidos, debido a las alteraciones que ocasiona en el metabolismo de los caracoles, principalmente a nivel de proteínas, enzimas y carbohidratos (Tiwari et al. 2004; Singh et al. 2004; Singh et al. 2005; Mello-silva et al. 2006; Mello-silva et al. 2010; Mello-silva et al. 2011; Lima et al. 2012); ocasionando que los tejidos reciban menos oxígeno, lo que conlleva a cuadros de hipoxia que generan posteriormente la necrosis y lisis de las células (Tiwari & Singh 2005; Patel et al. 2011; Araújo et al. 2002), alterando de esta manera sus funciones fisiológicas, lo que deviene en la muerte de los caracoles (Yadav & Jagannadham 2008); además, se ha demostrado en los trabajos de Mello-silva et al. (2007) y Chauhan & Singh (2011) que el látex de las *Euphorbias*, en dosis sub letales, afectan la actividad reproductiva de los caracoles *Biomphalaria glabrata* y *Lymnaea acuminata*.

Las dosis letal cincuenta y noventa encontradas en el presente trabajo (DL<sub>90</sub>: 4,85 mg/l y DL<sub>50</sub>: 1,91 mg/l), se encuentran dentro del rango encontrado por otros investigadores para el caso del látex de la *Euphorbia splendens*, que van entre 0,32 mg/l hasta 5 mg/l ((Vasconcelos & Schall 1986; Freitas et al. 1991; Schall et al. 1992; Schall et al. 1998; Vasconcellos & Amorim 2003; Mello-silva et al. 2006; Mello-silva et al. 2011); siendo las concentraciones más bajas que en las otras especies de la familia *Euphorbiaceae* (Alfonso-neto et al. 2010), por ejemplo para el caso de la *Euphorbia myrsinites* se necesita DL<sub>50</sub> de 15,1 y 8,9 ppm (Patel et al. 2011), para *Euphorbia hirta* se requiere una DL<sub>90</sub> de 9,05 mg/l (Yadav & Singh 2011); esta característica del látex de la *Euphorbia splendens* permite que los daños al medio ambiente sean menores (Mello-silva et al. 2006); así mismo es importante recalcar que la manipulación y preparación de las dosis letal cincuenta y noventa son sencillas y se pueden replicar con facilidad en el campo (Schall et al. 1992), razón por la cual se puede considerar una alternativa viable en el control de la Fasciolosis en la región; solo hay que tener en cuenta al momento de utilizarlo su sensibilidad a la fotodegradación (Oliveira-Filho & Paumgarten 1997).

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### **Conclusiones:**

La exposición del caracol *Lymnaea sp.* al látex de la *Euphorbia splendens* afecta su metabolismo proteico en forma positiva, esto es, a mayor concentración del látex, mayor concentración de proteínas.

El látex de la *Euphorbia splendens* afecta la producción ácido úrico y urea en los caracoles *Lymnaea sp.* en una relación negativa, esto es, a mayor concentración del látex, menor concentración de ácido úrico y urea en los fluidos corporales del caracol.

El látex de la *Euphorbia splendens* tiene efecto molusquicida, a una dosis letal media de 1,91 mg/l, mientras que la dosis letal noventa es de 4,85 mg/l.

La exposición de los caracoles *Lymnaea sp.* al látex de la *Euphorbia splendens* afecta de manera similar su metabolismo proteico, tanto en los infectados como en los libres de *Fasciola hepatica*, ya que en ambos se incrementan los niveles de proteína en los fluidos corporales.

**Recomendaciones:**

Se recomienda continuar evaluando la acción del látex crudo de *Euphorbia splendens* sobre los diferentes tejidos del caracol; así como el tiempo, para ver cuál es la evolución de las concentraciones de las proteínas totales en el caracol y de otros productos necesarios para la supervivencia del mismo.

Se recomienda que en un siguiente estudio se evalúe la acción molusquicida del látex crudo de la *Euphorbia splendens*, bajo condiciones de campo, y en diferentes momentos.

## LISTADO DE REFERENCIAS

- A Dos Santos, J., Coelho, T., Drummond, D., Ribeiro, I., Teixeira, M. & Buarque, Z., 2003. Molluscicidal activity of *Physalis angulata* L. extracts and fractions on *Biomphalaria tenagophila* (d' Orbigny, 1835) under laboratory conditions. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, 98(3), pp.425–428.
- Alfonso-neto, I., Bessa, E. & Soares, G., 2010. Avaliação da atividade moluscicida do látex de três espécies de *Euphorbia* (*Euphorbiaceae*) sobre *Leptinaria unilamellata* D' Orbigny, 1835 (Gastropoda - Subulinidae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 12(1), pp.90–95.
- Andrews, S., 1999. The Life Cycle of *Fasciola hepatica*. In J. Dalton, ed. *Fasciolosis*. CAB INTERNATIONAL, Dublin.
- Antón, Y. & Salazar-Lugo, R., 2009. El sistema inmune de los invertebrados - The immune system of the invertebrates ). *Revista Electrónica de Veterinaria*, 10(9).
- Araújo, S., Pile, E., Barros, J., Santos, J. & Vasconcellos, M., 2002. Alterações histológicas em *Lymnaea columella* provocadas pelo látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopilii*, *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 39 (3), pp. 157-159.
- Baptista, D., Vasconcellos, M., Lopes, F., Silva, I. & Schall, V., 1992. Evaluation of the molluscicidal properties of *Euphorbia splendens* 2 lotic habitat. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, 87(4), pp.549–553.
- Baptista, D., Vasconcellos, M., Lopes, F., Silva, I. & Schall, V., 1994. Perspectives of using *Euphorbia splendens* as a molluscicide in schistosomiasis control programs. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 25(3), pp.419–424.
- Bargues, M., Artigas, P., Khoubbane, M., Ortiz, P., Naquira, C. & Mas-Coma, S., 2012. Molecular characterisation of *Galba truncatula*, *Lymnaea neotropica* and *L. schirazensis* from Cajamarca, Peru and their potential role in transmission of human and animal fascioliasis. *Parasites & Vectors*, 5, pp.1–16.
- Barnes, R. & Ruppert, E., 1996. *Zoología de los Invertebrados*, 6ta. ed, McGraw - Hill Interamericana, México.
- Berg, G., 1994. *Caracoles y babosas de importancia cuarentenaria, agrícola y médica para América Latina y El Caribe*. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA) report no. 2, San Salvador.

- Borchert, A., 1964. *Parasitología Veterinaria*, 3era ed, Acribia, Zaragoza - España.
- Calderón, T., 2011. 'Eficacia del clorsulón, closantel, nitroxinil y triclabendazol en el control de *Fasciola hepatica* en vacunos del predio San Luis - Distrito Gregorio Pita - Provincia San Marcos – Cajamarca', Tesis para optar el título de Médico Veterinario, Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca.
- Chapuis, E., 2009. Correlation between parasite prevalence and adult size in a trematode-mollusc system: evidence for evolutionary gigantism in the freshwater snail *Galba truncatula*? *Journal of Molluscan Studies*, 75(4), pp. 391-396.
- Chauhan, S. & Singh, A., 2011. Impact of taraxerol in combination with extract of *Euphorbia tirucalli* plant on biological parameters of *Lymnaea acuminata*. *Revista de Investigación de Medicina Tropical de Sao Paolo*, 53(5), pp.265–270.
- Chuquiruna, M., 2011. 'Frecuencia de fasciolosis y cisticercosis en animales beneficiados en el camal municipal de Baños del Inca', Tesis para optar el título de Médico Veterinario, Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca.
- Cornejo, H., Oblitas, F., Cruzado, S. & Quispe, W., 2010. Evaluación de una prueba de ELISA con antígeno metabólico de *Fasciola hepatica* para el diagnóstico de fasciolosis humana en Cajamarca, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental en Salud Pública*, 27(4), pp.569–574.
- Correa, A., Escobar J., Noya, O., Velásquez, L., Gónzales-Ramírez, C., Hurtrez-Boussés, S., & Pointier, J., 2011. Caracterización morfológica y molecular de *Lymnaeidae* (Gastropoda: Hygrophila) de la región neotropical. *Revista Biomedica*, 31(3), p.201.
- Costa, J., 2010. 'Caracterização funcional e estrutural de novas proteases isoladas da peçonha de *Bothrops alternatus* e do látex de *Euphorbia milii* var. *Hislopii*'. Tese Doutorado, Universidad Federal de Uberlandia, Uberlandia - Brazil.
- Delgado, I. & Paumgarten, F., 2014. Effects of *Euphorbia milii* latex on mitogen-induced lymphocyte proliferation. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 16(1), pp.107–111.
- De Nardi, R., 2011. 'Ação moluscicida do látex de *Euphorbia milii* Des Moul. var. *splendens* (Ursch & Leandri) EM *Achatina fulica* (Bowdich, 1822) e seu efeito em biomarcadores ambientais', Tesis Mag. Sc. Em Ecologia de Ecosistemas, Centro Universitário de Vila Velha, Brazil.
- Duthaler, U., Smith, T. & Keiser, J., 2010. In vivo and in vitro sensitivity of *Fasciola hepatica* to triclabendazole combined with artesunate, artemether, or OZ78.

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(11), pp.4596–604.
- Ekram, S. & Najia, A., 2006. Mammal toxicity and mutagenicity assessment of the methanol extract of the molluscicidal plant *Euphorbia schimperiana*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9(10), pp.1911–1916.
- Espinoza, J., Terashima, A., Herrera-Velut, P. & Marcos, L., 2010. Fasciolosis humana y animal en el Perú: Impacto en la economía de las zonas endémicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental en Salud Pública*, 27(4), pp.604–612.
- Fredes, F., 2004. Fasciolosis animal y humana. *Monografías Electrónicas de Patología Veterinaria*, 1, pp.38–67.
- Freitas, J., Presgrave, O., Fingola, F., Menezes, M., Vasconcellos, M., Schall, V. & Paumgarten, F., 1991. Toxicological study of the molluscicidal latex of *Euphorbia splendens* irritant action on skin and eye. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, 86(2), pp.87 – 88.
- Giovanelli, A., Silva, L., Medeiros, L. & Vasconcellos, M., 2002. The molluscicidal activity of niclosamide (Bayluscide WP70 ®) on *Melanoides tuberculata* (Thiaridae), a snail associated with habitats of *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae). *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, 97(5), pp.743–745.
- González, L., Esteban, J., BARGUES, M., Valero, M., Ortiz, P., Naquira, C. & Mas-Coma, S., 2011. Hyperendemic human fascioliasis in Andean valleys: An altitudinal transect analysis in children of Cajamarca province, Peru. *Acta Tropica*, 120(1–2), pp.119–129.
- Hermann, P., Genereux, B. & Wildering, W., 2009. Evidence for age-dependent mating strategies in the simultaneous hermaphrodite snail, *Lymnaea stagnalis* (L.). *Experimental Biology*, 212, pp.3164–3173.
- Huamán, N.E., 2011. ‘Frecuencia de fasciolosis y cisticercosis en animales beneficiados en el camal municipal de Cajamarca’, Tesis para optar el título de Médico Veterinario, Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca.
- Lima, M., Augusto, R. & Vasconcellos, M., 2012. Metabolic changes in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* exposed to latex of *Euphorbia milii* solution versus times of preparation. *Journal of Natural Products*, 5, pp.222–232.
- Lukowiak, K., Martens, K., Rosenegger, D., Browning, K., Caigny, P. & Orr, M., 2008. The perception of stress alters adaptive behaviours in *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Experimental Biology*, 211, pp.1747–1756.
- Mamani, W. & Condori, R., 2009. Determinación de resistencia antihelmíntica

- (*Fasciola hepatica*) en ovinos frente a albendazol y triclabendazol, La Paz – Bolivia. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 20(2), pp.254–262.
- Marcos, L., Terashima, A., Leguia, G., Canales, M., Espinoza, J. & Gotuzzo, E., 2007. La infección por *Fasciola hepatica* en el Perú: una enfermedad emergente. *Revista de Gastroenterología*, 27, pp.389–396.
- Martínez, C., 2005. *Sección de Ornamentales y Propagación: Aspectos generales de la propagación convencional*. El Zamorano, Honduras.
- Mata, R., Mendonca, D., Vieira, L., Santos, A., Silva, L., Gaspar, F., Martins, C., Rueff, J. & Sant’Ana, A., 2011. Molluscicidal activity of compounds isolated from *Euphorbia conspicua* NE Br. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(10), pp.1880–1887.
- Mello-silva, C., Vasconcellos, M., Pinheiro, J. & Rodrigues, M., 2006. Physiological changes in *Biomphalaria glabrata* Say , 1818 (Pulmonata : Planorbidae) caused by sub-lethal concentrations of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N. E. B. (Euphorbiaceae). *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, 101(1), pp.3–8.
- Mello-silva, C., Vilar, M., Barreto, J., Vasconcellos, M., Pinheiro, J. & Rodrigues, M., 2007. Reproductive activity alterations on the *Biomphalaria glabrata* exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, 102(6), pp.671–674.
- Mello-silva, C., Vilar, M., Vasconcellos, M., Pinheiro, J. & Rodrigues, M., 2010. Carbohydrate metabolism alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* and exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex., *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, 105(4), pp.492–495.
- Mello-silva, C., Vasconcellos, M., Barreto, J., Rodrigues, M. & Pinheiro, J., 2011. The influence of exposure to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex on the concentrations of total proteins and nitrogen products in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. *Acta tropica*, 117, pp.101–104.
- Mendes, N., Baptista, D., Vasconcellos, M. & Schall, V., 1992. Evaluation of the molluscicidal properties of *Euphorbia splendens* 1 experimental test in a lentic habitac. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, 87(1), pp.21–23.
- Mendes, N., Vasconcellos, M., Baptista, D., Rocha R. & Schall, V., 1997. Evaluation of the molluscicidal properties of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (N. E. B.) latex : Experimental test in an endemic area in the atate of Minas Gerais, Brazil., *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, 92(5), pp.719–724.

- Olaechea, F. V, 2004. '*Fasciola hepatica*', conferencia presentada en la *Red de Helmintología de FAO para América Latina y el Caribe*, Septiembre – 2004, consultado el 28 de marzo del 2013, [http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-trematodos\\_y\\_cestodes.pdf](http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-trematodos_y_cestodes.pdf)
- Oliveira-Filho, E., De-Carvalho, R. & Paumgarten, F., 1999. The influence of environmental factors on the molluscicidal activity of *Euphorbia milii* latex. *Journal of Environmental Science & Health Part B*, 34(2), pp.289–303.
- Oliveira-Filho, E. & Paumgarten, F., 1997. Photodegradation of the molluscicidal latex of “Crown-of-Thorns” (*Euphorbia milii* var *hislopii*). *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, 92(5), pp.657–659.
- Oliveira-Filho, E. & Paumgarten, F., 2000. Toxicity of *Euphorbia milii* latex and niclosamide to snails and nontarget aquatic species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46(3), pp.342–350.
- Oliveira-Filho, E., Geraldino, B., Coelho, D., De-carvalho, R. & Paumgarten, F., 2010. Comparative toxicity of *Euphorbia milii* latex and synthetic molluscicides to *Biomphalaria glabrata* embryos. *Chemosphere*, 81(2), pp.218–227.
- Ortiz, P., Scarcella, S., Cerna, C., Rosales, C., Cabrera, M., Guzmán, M., Lamenza, P. & Solana, H., 2013. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): A clinical trial and an in vivo efficacy test in sheep. *Veterinary Parasitology*, 195(1-2), pp.118 –121.
- Patel, A., Wright, D., Blunden, G., Sumner, S. & Rice, J., 2011. Stable molluscicide formulation of an aqueous extract of *Euphorbia myrsinites*. *Phytotherapy Research*, 25(9), pp.1412–1414.
- Pile, E., Coelho, B. & Santos, J., 1998. Alteraciones histopatológicas en *Lymnaea columella* (*Pulmonata: Lymnaeidae*), huespéd intermediario de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (*Trematoda: Fasciolidae*), causadas por *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B. *Parasitología al día*, 22(3), pp.105 – 107.
- Pinheiro, J., Maldonado, A. & Lanfredi, R., 2009. Physiocological changes in *Lymnaea columella* (Say, 1817) (*Mollusca, Gastropoda*) in response to Echinostomatidae infection. *Parasitology Research*, 106(1), pp.55 – 59.
- Quiroz, H., 2003. *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*, Limusa, México.
- Ramos, S., 2002. *Distribución y taxonomía de caracoles de agua dulce (Molusca: Basommatophora) en la región de la Sierra Fría - Zacatecas*, Universidad

- Autónoma de Zacatecas – CONABIO, report no. L145, México.
- Rodwell, V.W., 2009. 'Metabolismo de proteínas y aminoácido' In Murray, R., Bender, D., Botham, K., Kennelly, P., Rodwell, V. & weil, A. (ed.), *Harper Bioquímica ilustrada*. 28 ava ed, Mc Graw Hill. Interamericana, México, pp. 234 – 270.
- Rojas, J., Rondón, M., Meccia, G. & Morales, A., 2008. Análisis por CG/EM de hidrocarburos y compuestos terpénicos en las especies *Euphorbia caracasana* Boiss y *Euphorbia cotinifolia* L. (*Euphorbiaceae*). *Revista Latinoamericana de Química*, 36(1), pp.22–28.
- Rojas, J., 2012. Resistencia de *Fasciola hepatica* al triclabendazol en bovinos de la campiña de Cajamarca - Perú. *Revista Veterinaria Argentina*, 29(296), consultado el 25 de octubre del 2012, <http://www.veterinariargentina.com/revista/2012/07/resistencia-de-fasciola-hepatica-al-triclabendazol-en-bovinos-de-la-campiña-de-cajamarca-peru/>
- Rondoy, L., 2014. *Bioquímica metabólica de los animales domésticos*. Universidad Nacional de Piura, Piura.
- Salazar, L., Estrada, V. & Velásquez, L., 2006. Effect of the exposure to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) on life history traits of *Lymnaea cousini* and *Lymnaea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae). *Experimental Parasitology*, 114(2), pp.77–83.
- Santos, A., Azevedo, D., Mata, R., Mendonca, D. & Goulart, A., 2007. The lethality of *Euphorbia conspicua* to adults of *Biomphalaria glabrata*, cercaria of *Schistosoma mansoni* and larvae of *Artemia salina*. *Bioresource Technology*, 98(1), pp.135 – 139.
- Schall, V., Vasconcellos, M., Villaca-coelho, A., Ferreira-lobes, F. & Silva, I., 1992. Evaluation of temporal, seasonal and geographic stability of the mollescicidal property of *Euphorbia splendens* latex. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 34(3), pp.183 – 191.
- Schall, V., Vasconcellos, M., Pereira, C. & Baptista, D., 1998. The molluscicidal activity of crown of christ (*Euphorbia splendens* var. *hislopian*) latex on snails acting as intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 58(1), pp.7–10.
- Schall, V., Vasconcellos, M., Rocha, R., Pereira, C. & Mendes, N., 2001. The control of the schistosome-transmitting snail *Biomphalaria glabrata* by the plant

- molluscicide *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (syn *milli* Des. Moul): a longitudinal field study in an endemic area in Brazil. *Acta tropica*, 79(2), pp.165–170.
- SENAMHI, 2014. Datos generales. [www.senamhi.gop.pe](http://www.senamhi.gop.pe) -sede Cajamarca. Visitado el 14 de agosto del 2014.
- Seshagirirao, K. & Prasad, M., 2001. Latex biochemistry of certain Euphorbiaceaus taxa: medicinal importance. In P. Saxena (ed), *Development of plant based medicines: conservation, efficacy and safety*, Springer, India, pp. 199 – 201.
- Singh, S., Yadav, R., Tiwari, S. & Singh, A., 2005. Toxic effect of stem bark and leaf of *Euphorbia hirta* plant against freshwater vector snail *Lymnaea acuminata*. *Chemosphere*, 59(2), pp.263 – 270.
- Singh, S., Yadav, R., Singh, D. & Singh, A., 2004. Toxic effect of two common Euphorbiates latices on the freshwater snail *Lymnaea acuminata*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 15(2 -3), pp.87 – 93.
- Soare, L. & Dobrescu, C., 2009. Anatomical peculiarities of stem and leaf in *Euphorbia splendens*. *Lucrari Stiintifice, Universitatea de Stiinte Agricole Si Medicina Veterinara "Ion Ionescu de la Brad" Lasi, Seria Horticultura*, 52, pp.95 – 100.
- Sokolinaa, F., Ríos, J., Ignatieva, G., Villaseñor, C., Orozco, J., Sánchez-vega, C., Fuentes, H. & Zavala, J., 2012. Estudio de los tejidos de moluscos *Lymnaea truncatula* y *Lymnaea cubensis* infectados por miracidios de *Fasciola hepatica*. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 55(6), pp.4 – 10.
- Soulsby, E., 1982. *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos*, 7ma ed., Editorial Interamericana, México.
- Teixeira, T., Silvino, J., Rainha, N., Baptista, J. & Rodrigues, A., 2012. Assessment of molluscicidal activity of essential oils from five Azorean plants against *Radix peregra* (Müller , 1774). *Chemosphere*, 87, pp.1–6.
- Terán, J., 2011. 'Eficacia de cuatro grupos químicos fasciolicidas en el control de fasciolosis en bovinos del predio Quebrada Honda en el Distrito de Tumbadén - Provincia de San Pablo – Cajamarca', Tesis para optar el título de Médico Veterinario, Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca.
- Tiwari, S. & Singh, A., 2005. Alterations in carbohydrates and the protein metabolism of the harmful freshwater vector snail *Lymnaea acuminata* induced by the *Euphorbia tirucalli* latex extract. *Environmental Research*, 99(3), pp.378–386.
- Tiwari, S., Singh, S. & Singh, A., 2004. Toxicological effect and biochemical

- alterations induced by different fractions of *Euphorbia royleana* latex in freshwater harmful vector snail *Lymnaea acuminata*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 42(12), pp.1220–1225.
- Urquhart, G., Armour, J., Duncan, J., Dunn, A. & Jennings, F., 2001. *Parasitología Veterinaria* 2nd ed., Acribia S.A., Zaragoza – España.
- Vasconcellos, M. & Amorim, A., 2003. Molluscicidal action of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N. E. B. (“Christ’s Crown”) (*Euphorbiaceae*) against *Lymnaea columella* (Say, 1817) (*Pulmonata: Lymnaeidae*), Intermediate host of *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, 98(4), pp.557–563.
- Vasconcellos, M., Santos, J., Silva, I., Ferreira-lobes, F. & Schall, V., 2003. Molluscicidal activity of Crown of Christ (*Euphorbia splendens* var. *hislopii*) (*Euphorbiaceae*) latex submitte to pH varation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46(3), pp.415–420.
- Vasconcelos, M. & Schall, V., 1986. Latex of “Coroa de Cristo” (*Euphorbia splendens*): an effective molluscicide. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, 81(4), pp.475–476.
- Velásquez, L., Vivero, R., Villareal, R., Guzmán, C., Gómez, C., Alarcón, E., Fernández, A., Gómez, N. & Becerra, W., 2011. Diferenciación específica de limneidos en Colombia, utilizando el gen de la citocromo oxidasa I. *Revista Biomédica*, 31(3), p.203.
- Yadav, R., Patel, A. & Jagannadham, M., 2011. Purification and biochemical characterization of a chymotrypsin - like serine protease from *Euphorbia nerifolia* Linn. *Process Biochemistry*, 46(8), pp.1654 – 1662.
- Yadav, R., Patel, A. & Jagannadham, M., 2012. Neriifolin S, a dimeric serine proteasa from *Euphorbia nerifolia* Linn: Purification and biochemical characterisation. *Food Chemistry*, 132(3), pp.1296 – 1304.
- Yadav, R. & Singh, A., 2011. Efficacy of *Euphorbia hirta* latex as plant derived molluscicides against freshwater snails. *Revista de Investigación de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 53(2), pp.101–106.
- Yadav, R., Singh, D., Singh, S. & Singh, A., 2006. Effects of extracts of the bark of the stem of *Croton tiglium* on the metabolism of the freshwater gastropod *Lymnaea acuminata*. *American Malacological Bulletin*, 21(1-2), pp.87–92.
- Yadav, S., Pande, M. & Jagannadham, M., 2006. Highly stable glycosylated serine

proteasa from the medicinal plant *Euphorbia milii*. *Phytochemistry*, 67(14), pp.1414 – 1426.

Yadav, S. & Jagannadham, M., 2008. Physiological changes and molluscicidal effects of crude latex and Milin on *Biomphalaria glabrata*, *Chemosphere*, 71, pp.1295–1300.

Zamith, H., Paumgarten, F. & Speit, G., 1996. Evaluation of the mutagenicity of the molluscicidal latex of Christ's Crown (*Euphorbia milii* var. *hislopii*) in mammalian cells in vitro and in vivo. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 368(1), pp.15–20.

Zani, C., Marston, A., Hamburger, M. & Hostettmann, K., 1993. Molluscicidal milliamines from *Euphorbia milii* var. *hislopii*. *The International Journal of Plant Biochemistry: Phytochemistry*, 34(1), pp.89–95.

# ANEXOS

## ANEXO 1

### OBTENCIÓN DE FLUIDO CORPORAL DEL CARACOL SP.

#### MATERIALES Y EQUIPOS:

- 05 Caracoles *Lymnaea sp.*
- Agua destilada
- Papel absorbente
- Estilete
- Microtubos Ependorf, de 01 ml de capacidad
- Microviales para PCR
- Micro pipetas 0 – 10 ul
- Puntas de 10 ul
- Agitador
- Centrífuga

#### PROCEDIMIENTO

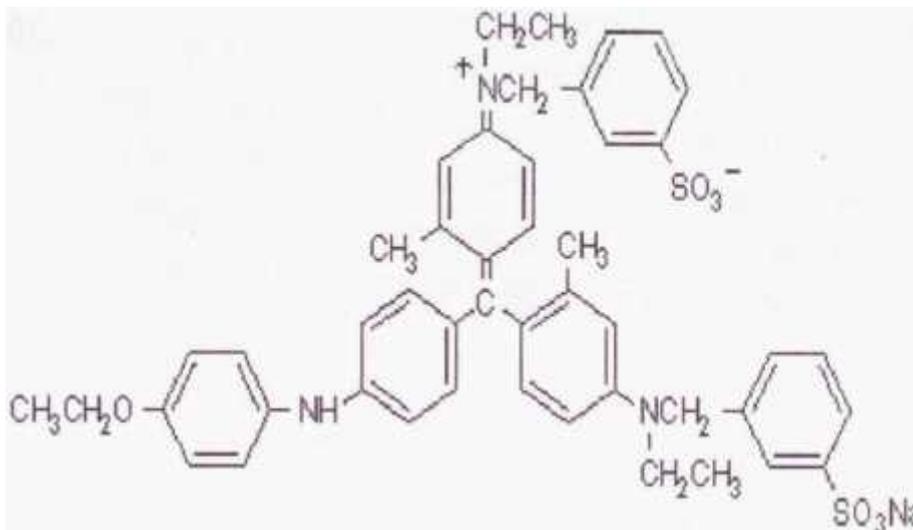
1. Se toma 05 caracoles del tratamiento a evaluar, se los lava con agua destilada, por 03 oportunidades, a fin de retirar los restos de lodo y desechos que pueden haber en su cuerpo.
2. Se los deja secar sobre un pedazo de papel absorbente, por espacio de 10 minutos.
3. En un microtubo, debidamente rotulado con el código de tratamiento que le corresponde y número de evaluación; se coloca 20 ul de agua destilada.
4. Se procede a colocar dentro de los microtubos con agua destilada a los 05 caracoles previamente secados, y se los tritura con la ayuda del estilete.
5. Una vez que han sido totalmente triturados y se cuenta con una masa uniforme, se lleva al agitador por espacio de 10 segundos aproximadamente.
6. Luego se centrifuga a una temperatura de 15°C, a 15 000 rpm, por un tiempo de 30 minutos.
7. Finalmente con la ayuda de una micropipeta, se retira el fluido corporal separado de la parte sólida del caracol.
8. Se refrigera a -20°C hasta que sea utilizado para determinar proteínas totales, así como ácido úrico y urea.

## ANEXO 2

### MÉTODO DE BRADFORD PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEINAS TOTALES

**Principio:** para el presente método se emplea un colorante hidrofóbico cuyas disoluciones acuosas en presencia del ácido fosfórico tienen un color pardo y que, al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una proteína, origina un color azul intenso que se puede medir fácilmente.

Método basado en el cambio de color del colorante Coomassie brilliant blue G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. Este compuesto interacciona con aminoácidos básicos (especialmente arginina) y aromáticos. Esta unión del colorante con las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm. Por lo tanto, este método se basa en la propiedad del Azul Brillante de Coomassie G-250 de presentarse en dos formas con colores diferentes, rojo y azul. La forma roja se convierte en azul cuando el colorante se une a la proteína. Experimentalmente se mide la diferencia de Absorbancias entre 595 y 465 nm (595-465nm).



Estructura química del colorante Coomassie brilliant blue G-250.

## **DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO:**

### **Materiales y reactivos a usar:**

- Tubos de ensayo de 5 ml
- Gradilla
- Micropipetas de 1ml y 100 ul
- Ependorfd
- Espectrofotómetro
- Kit Bradford
- Agua destilada

Kit de Bradford para la determinación de proteínas totales de BioRam<sup>R</sup>, el cual consiste en los siguientes materiales:

- Reactivo Bradford
- Estándares de suero de albumina bovina: de 0,125 mg a 1000 mg/ml

Inicialmente se establece una curva de calibración con los estándares respectivos, para lo cual se sigue el siguiente procedimiento:

1. Etiquetar 06 tubos de ensayo de 05 ml, con la siguiente denominación:
  - B: Blanco
  - 0,125 mg/ml
  - 0,250 mg/ml
  - 0,500 mg/ml
  - 0,750 mg/ml
  - 1000 mg/ml
2. Colocar en los 06 tubos 1 ml de reactivo Bradford
3. Agregar 20 ul del estándar respectivo a cada tubo de ensayo
4. Agitar
5. Proceder a leer en el espectrofotómetro
6. Elaborar la curva de calibración, con los datos obtenidos.

Luego de haber elaborado la curva de calibración se procede a preparar las muestras obtenidas de los caracoles, en tal sentido se procede de la siguiente manera:

1. De los fluidos corporales del caracol, se extrae 10 ul y se diluye en 40 ul de agua destilada, a fin de obtener una dilución de 1:5
2. De esta dilución inicial se toma 10 ul y se diluye en 90 ul de agua, obteniendo una dilución de 1:100
3. Se etiquetan los tubos de ensayo de 5 ml, con los tratamientos respectivos.
4. Se agrega 1 ml de reactivo Bradford a cada tubo de ensayo
5. Posteriormente se agrega 20 ul de muestra
6. Agitar
7. Se lee en el espectrofotómetro, con absorbancia de 465 a 595 nm
8. Los datos obtenidos se compara con los de la curva de calibración a fin de ubicarlos dentro de la curva.

### ANEXO 3

#### DATOS DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Tabla 7: Determinación de absorbancia de los estándares de BSA

Concentración de estándares (mg/ml)	Cantidad de Muestra usada (ul)	Cantidad de reactivo usado (ul)	Absorbancia
Blanco (0)	20	1000	0,5635
0,125	20	1000	0,6989
0,250	20	1000	0,8588
0,500	20	1000	1,0018
0,750	20	1000	1,2800
1,000	20	1000	1,5064

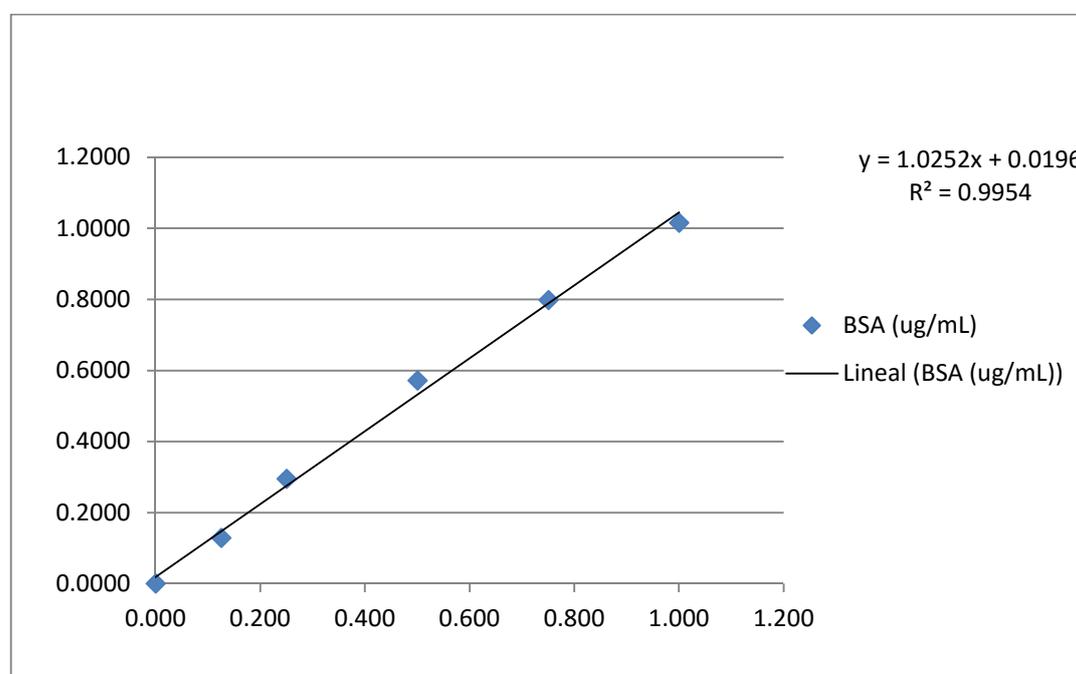


Figura 19: Curva de calibración de BSA

## ANEXO 4

### PRUEBAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ÚRICO Y UREA

#### TEST PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ÚRICO – ROCHE

##### **Principio del test:**

El presente test de determinación de ácido úrico se basa en una reacción enzimática y colorimétrico, en donde el ácido úrico es desdoblado por la uricasa a alantoína y peróxido de hidrogeno, teniendo al final como producto al colorante quinona diimina. La intensidad cromática de la quinona diimina formada es directamente proporcional a la concentración de ácido úrico y es determinada midiendo el aumento de la absorbancia.

##### **Reactivos y soluciones de trabajo:**

R1: Tampón fosfato: 0,05 mol/L, pH 7,8; TOOS: 7 mmol/L; éter poliglicólico de alcohol graso: 4,8%; ascorbato oxidasa (EC 1.10.3.3; calabacín): > 83,5 ukat/L (25°C); estabilizadores y conservantes.

SR: Tampón fosfato: 0,1 mol/L, pH 7,8; hexacianoferrato (II) de potasio: 0,3 mmol/L; 4-aminofenazona: > 2,5 mmol/L; uricasa (EC 1.7.3.3; *Arthrobacter protophormiae*): > 83,4 ukat/L (25°C); peroxidasa (POD) (EC 1.11.1.7; rábano picante): > 50,0 ukat/L (25°C); estabilizadores y conservantes.

Estos reactivos se encuentran listos para ser usados.

##### **Conservación y estabilidad:**

De 2 a 8 °C, sin abrir; en casos de estar en uso mantener bajo condiciones de refrigeración y por espacio de 04 semanas.

##### **Intervalo de medición:**

De 0,20 a 25 mg/dL de ácido úrico en plasma.

## TEST PARA LA DETERMINACIÓN DE UREA – ROCHE

### Principio del test:

El presente test de determinación de urea, se basa en un proceso enzimático con la acción de la ureasa y la glutamato deshidrogenasa.

En un primer momento la urea es hidrolizada por la ureasa a Amonio y carbonato; mientras que en segunda reacción, el 2 – oxoglutarato reacciona con el amonio en presencia de la glutamato deshidrogenasa (GLDH) y la coenzima NADH para producir L – glutamato. En esta reacción por cada molécula de urea hidrolizada se oxidan dos moles de NADH a NAD.

La velocidad con que la concentración de NADH disminuye es directamente proporcional a la concentración de urea en la muestra y se mide fotométricamente.

### Reactivos y soluciones de trabajo:

R1: Tampón TRIS: 220 mmol/L, pH 8,6; 2 – oxoglutarato: 73 mmol/L; NADH: 2,5 mmol/L; ADP: 6,5 mmol/L; ureasa(haba blanca): > 300 ukat/L; GLDH (hígado bovino): > 80 ukat/L; conservante.

Estos reactivos se encuentran listos para ser usados.

### Conservación y estabilidad:

De 2 a 8 °C, sin abrir; en casos de estar en uso mantener bajo condiciones de refrigeración y por espacio de 04 semanas.

### Intervalo de medición:

De 3,0 a 240 mg/dL de urea presente en plasma.

## ANEXO 5

### PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO DE INFORMACIÓN RECOGIDA

#### DATOS OBTENIDOS DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS

**Tabla 8: Lymneidos libres de estadios larvarios de *Fasciola hepatica* expuestos a diferentes concentraciones de látex de *Euphorbia splendens***

Grupo	Proteína mg/ml	Acido úrico mg/dl	Urea mg/dl	Concentración de látex mg/l
<b>Control</b>	14,7463	0,735	53,15	0,00
	14,2639	0,85	50,75	0,00
	15,2585	0,23	45,35	0,00
<b>1</b>	20,5345	0,50	46,65	0,10
	20,5902	0,05	42,00	0,10
	20,3073	0,40	31,65	0,10
<b>2</b>	21,2049	0,50	46,15	0,20
	20,1463	0,30	25,50	0,20
	21,0195		22,70	0,20
<b>3</b>	22,1463	0,435	45,85	0,40
	22,239	0,15	25,65	0,40
	22,9707		25,90	0,40
<b>4</b>	29,2488	0,30	43,25	0,60
	26,3268	0,30	35,00	0,60
	27,7366	0,20	47,50	0,60
<b>5</b>	30,3268	0,30	41,50	0,80
	32,1228	0,10	29,00	0,80
	27,639	0,05	42,45	0,80
<b>6</b>	31,2146	0,30	40,40	1,00
	30,4878	0,10	38,45	1,00
	33,5561	0,15	39,15	1,00
<b>7</b>	36,1756	0,10	38,45	1,50
	35,3854	0,15	32,15	1,50
	36,3336	0,15	23,10	1,50
<b>8</b>	37,7951	0,10	35,10	2,00
	38,1513	0,15	29,05	2,00
	37,9707	0,15	35,15	2,00
<b>9</b>	41,2878	0,10	32,15	2,50
	43,1071	0,10	29,80	2,50
	40,1518	0,10	29,75	2,50
<b>10</b>	45,0878	0,10	25,65	5,00
	47,1310	0,10	17,80	5,00
	45,3895	0,10	23,10	5,00
<b>11</b>	48,9951	0,10	24,25	10,00
	52,751	0,10	17,47	10,00
	49,1326	0,10	17,20	10,00

**Tabla 9: Lymneidos infectados con estadíos larvarios de *Fasciola hepatica*,  
expuestos a diferentes concentraciones de látex de *Euphorbia splendens***

<b>Grupo</b>	<b>Proteína mg/ml</b>	<b>Acido úrico mg/dl</b>	<b>Urea mg/dl</b>	<b>Concentración de látex mg/l</b>
<b>Control</b>	12,1805	1,30	14,50	0,00
	14,4732	1,85	12,50	0,00
	13,3269	1,60	13,50	0,00
<b>1</b>	15,5707	1,30	11,00	0,10
	16,2098	1,45	9,00	0,10
	15,6752	1,30	13,75	0,10
<b>2</b>	16,4634	1,20	6,00	0,20
	16,1320	1,15	6,20	0,20
	18,4586	1,25	8,75	0,20
<b>3</b>	17,5659	1,00	11,50	0,40
	17,9854	1,65	11,50	0,40
	19,6098	1,60	12,50	0,40
<b>4</b>	20,4439	1,35	6,75	0,60
	20,2000	1,45	10,50	0,60
	20,2780	0,95	8,10	0,60
<b>5</b>	20,7073	1,00	7,50	0,80
	21,6098	2,25	9,00	0,80
	24,8000	1,40	9,50	0,80
<b>6</b>	21,4683	1,15	8,00	1,00
	22,5854	1,50	8,50	1,00
	24,8293	1,60	10,00	1,00
<b>7</b>	24,8585	3,90	0,50	1,50
	25,6537	2,20	22,50	1,50
	25,5659	1,10	11,50	1,50
<b>8</b>	33,7024	1,70	14,00	2,00
	30,4878	0,25	9,50	2,00
	32,3577	0,90	10,35	2,00
<b>9</b>	35,8195	1,25	12,50	2,50
	25,7024	0,75	9,05	2,50
	32,1268	0,50	4,90	2,50
<b>10</b>	37,9707	1,50	14,50	5,00
	38,0862	1,40	14,00	5,00
	37,9756	1,00	13,35	5,00
<b>11</b>	44,6683	1,25	14,50	10,00
	47,7708	1,05	10,25	10,00
	46,6561	1,65	13,25	10,00

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE CARACOLES INFECTADOS CON ESTADÍOS LARVARIOS DE *Fasciola hepatica*

PROTEÍNA:

Tabla 10: Análisis de la varianza de proteína

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Proteína (mg/mL)	36	0,97	0,96	7,51

Tabla 11: Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3228,83	11	293,53	81,48	<0,0001
Látex (mg/mL)	3228,83	11	293,53	81,48	<0,0001
Error	86,46	24	3,60		
Total	3315,29	35			

**Tabla 12: Prueba de Tukey (Alfa=0,05 DMS=5,58785 Error: 3,6026 gl: 24)**

<b>Látex (mg/mL)</b>	<b>Medias</b>	<b>n</b>	<b>E.E.</b>								
<b>0,00</b>	13,33	3	1,10	A							
<b>0,10</b>	15,82	3	1,10	A	B						
<b>0,20</b>	17,02	3	1,10	A	B	C					
<b>0,40</b>	18,39	3	1,10	A	B	C	D				
<b>0,60</b>	20,31	3	1,10	B		C	D	E			
<b>0,80</b>	22,37	3	1,10	C			D	E			
<b>1,00</b>	22,96	3	1,10	D				E			
<b>1,50</b>	25,36	3	1,10	E							
<b>2,50</b>	31,22	3	1,10	F							
<b>2,00</b>	32,18	3	1,10	F							
<b>5,00</b>	38,01	3	1,10	G							
<b>10,00</b>	46,37	3	1,10	H							

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## ÁCIDO ÚRICO

**Tabla 13: Análisis de la varianza ácido úrico**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Ácido Úrico (mg/dL)	36	0,41	0,14	39,55

**Tabla 14: Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,20	11	0,02	1,52	0,1896
Látex (mg/mL)	0,20	11	0,02	1,52	0,1896
Error	0,29	24	0,01		
Total	0,49	35			

**Tabla 15: Prueba de Tukey (Alfa=0,05 DMS=0,32145 Error: 0,0119 gl: 24)**

Látex (mg/mL)	Medias	n	E.E.	
2,50	0,17	3	0,06	A
2,00	0,19	3	0,06	A
0,20	0,24	3	0,06	A
0,60	0,25	3	0,06	A
5,00	0,26	3	0,06	A
10,00	0,26	3	0,06	A
0,10	0,27	3	0,06	A
1,00	0,28	3	0,06	A
0,40	0,28	3	0,06	A
0,80	0,31	3	0,06	A
0,00	0,32	3	0,06	A
1,50	0,48	3	0,06	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## UREA

**Tabla 16: Análisis de Varianza urea**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Úrea (mg/dL)	36	0,34	0,03	34,46

**Tabla 17: Análisis de la Varianza (SC tipo I)**

F.V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6,58	11	0,60	1,11	0,3943
Látex (mg/mL)	6,58	11	0,60	1,11	0,3943
Error	12,92	24	0,54		
Total	19,50	35			

**Tabla 18: Prueba de Tukey (Alfa=0,05 DMS=2,15967 Error: 0,5382 gl: 24)**

Látex (mg/mL)	Medias	n	E.E.	
0,20	1,40	3	0,42	A
0,60	1,69	3	0,42	A
0,80	1,73	3	0,42	A
2,50	1,76	3	0,42	A
1,00	1,77	3	0,42	A
0,10	2,25	3	0,42	A
2,00	2,26	3	0,42	A
1,50	2,30	3	0,42	A
0,40	2,37	3	0,42	A
10,00	2,53	3	0,42	A
0,00	2,70	3	0,42	A
5,00	2,79	3	0,42	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Tabla 19: Análisis de regresión: proteína (mg/ml)**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	ECMP	AIC	BIC
<b>Proteína (mg/mL)</b>	36	0,84	0,83	18,59	206,01	210,76

**Tabla 20: Coeficientes de regresión y estadísticos asociados (proteína)**

Coef	Est.	E.E.	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	CpMallows	VIF
<b>const</b>	18,89	0,83	17,21	20,57	22,88	<0,0001		
<b>Látex (mg/mL)</b>	3,18	0,24	2,69	3,67	13,14	<0,0001	168,78	1,00

**Tabla 21: Análisis de regresión ácido úrico (mg/dl)**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	ECMP	AIC	BIC
<b>Ácido Úrico (mg/dL)</b>	36	0,01	0,00	0,02	-47,16	-42,41

**Tabla 22: Coeficientes de regresión y estadísticos asociados (ácido úrico)**

Coef	Est.	E.E.	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	CpMallows	VIF
<b>const</b>	0,28	0,02	0,23	0,33	11,56	<0,0001		
<b>Látex (mg/mL)</b>	-3,7E-03	0,01	-0,02	0,01	-0,51	0,6135	1,28	1,00

**Tabla 23: Análisis de regresión: urea (mg/dl)**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	ECMP	AIC	BIC
<b>Úrea (mg/dL)</b>	36	0,06	0,03	0,59	83,86	88,61

**Tabla 24: Coeficientes de regresión y estadísticos asociados (urea)**

Coef	Est.	E.E.	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	CpMallows	VIF
<b>const</b>	2,00	0,15	1,69	2,31	13,20	<0,0001		
<b>Látex (mg/mL)</b>	0,07	0,04	-0,02	0,16	1,47	0,1499	3,14	1,00

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE CARACOLES NO INFECTADOS CON ESTADÍOS LARVARIOS DE *Fasciola hepatica*

PROTEINA:

Tabla 25: Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Proteína	36	0,99	0,99	3,96

Tabla 26: Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4008,37	11	364,40	231,89	<0,0001
Látex	4008,37	11	364,40	231,89	<0,0001
Error	37,71	24	1,57		
Total	4046,08	35			

Tabla 27: Prueba de Tukey (Alfa=0,05 DMS=3,69046 Error: 1,5714 gl: 24)

Látex	Medias	n	E.E.			
0,00	14,76	3	0,72	A		
0,10	20,48	3	0,72		B	
0,20	20,79	3	0,72		B	
0,40	22,45	3	0,72		B	
0,60	27,77	3	0,72			C
0,80	30,03	3	0,72			C D
1,00	31,75	3	0,72			D
1,50	35,97	3	0,72			E
2,00	37,97	3	0,72			E F
2,50	41,52	3	0,72			F
5,00	45,87	3	0,72			G
10,00	50,29	3	0,72			H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## ÁCIDO ÚRICO

**Tabla 28: Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Ácido Úrico (mg/dL)	36	0,52	0,31	75,34

**Tabla 29: Análisis de la Varianza (SC tipo I)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,68	11	0,06	2,40	0,0352
Látex (mg/mL)	0,68	11	0,06	2,40	0,0352
Error	0,62	24	0,03		
Total	1,30	35			

**Tabla 30: Prueba de Tukey (Alfa=0,05 DMS=0,47188 Error: 0,0257 gl: 24)**

Látex (mg/mL)	Medias	n	E.E.		
2,50	0,10	3	0,09	A	
5,00	0,10	3	0,09	A	
10,00	0,10	3	0,09	A	
1,50	0,13	3	0,09	A	B
2,00	0,13	3	0,09	A	B
0,80	0,15	3	0,09	A	B
1,00	0,18	3	0,09	A	B
0,40	0,20	3	0,09	A	B
0,60	0,27	3	0,09	A	B
0,20	0,27	3	0,09	A	B
0,10	0,32	3	0,09	A	B
0,00	0,61	3	0,09		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## UREA

**Tabla 31: Análisis de Varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Úrea (mg/dL)	36	0,67	0,51	20,32

**Tabla 32: Análisis de la Varianza (SC tipo I)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
<b>Modelo.</b>	2293,50	11	208,50	4,34	0,0013
<b>Látex (mg/mL)</b>	2293,50	11	208,50	4,34	0,0013
<b>Error</b>	1153,44	24	48,06		
<b>Total</b>	3446,95	35			

**Tabla 33: Prueba de Tukey (Alfa=0,05 DMS=20,40930 Error: 48,0602 gl: 24)**

Látex (mg/mL)	Medias	n	E.E.			
<b>10,00</b>	19,64	3	4,00	A		
<b>5,00</b>	22,18	3	4,00	A	B	
<b>2,50</b>	30,57	3	4,00	A	B	C
<b>1,50</b>	31,23	3	4,00	A	B	C
<b>0,20</b>	31,45	3	4,00	A	B	C
<b>0,40</b>	32,47	3	4,00	A	B	C
<b>2,00</b>	33,10	3	4,00	A	B	C
<b>0,80</b>	37,65	3	4,00	A	B	C
<b>1,00</b>	39,33	3	4,00	A	B	C
<b>0,10</b>	40,10	3	4,00		B	C
<b>0,60</b>	41,92	3	4,00		B	C
<b>0,00</b>	49,75	3	4,00			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Tabla 34: Análisis de regresión: proteína (mg/ml)**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	ECMP	AIC	BIC
Proteína (mg/mL)	36	0,69	0,68	43,30	236,19	240,95

**Tabla 35: Coeficientes de regresión y estadísticos asociados (proteína)**

Coef	Est.	E.E.	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	CpMallows	VIF
const	25,23	1,26	22,68	27,79	20,10	<0,0001		
Látex (mg/mL)	3,19	0,37	2,44	3,94	8,66	<0,0001	73,95	1,00

**Tabla 36: Análisis de regresión ácido úrico (mg/dl)**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	ECMP	AIC	BIC
Ácido Úrico (mg/dL)	36	0,13	0,11	0,04	-16,63	-11,88

**Tabla 37: Coeficientes de regresión y estadísticos asociados (ácido úrico)**

Coef	Est.	E.E.	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	CpMallows	VIF
const	0,26	0,04	0,19	0,34	7,01	<0,0001		
Látex (mg/mL)	-0,03	0,01	-0,05	-2,7E-03	-2,28	0,0293	6,06	1,00

**Tabla 38: Análisis de regresión: urea (mg/dl)**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	ECMP	AIC	BIC
Úrea (mg/dL)	36	0,41	0,39	66,33	253,36	258,11

**Tabla 39: Coeficientes de regresión y estadísticos asociados (urea)**

Coef	Est.	E.E.	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	CpMallows	VIF
const	38,68	1,59	35,44	41,92	24,27	<0,0001		
Látex (mg/mL)	-2,27	0,47	-3,22	-1,32	-4,87	<0,0001	24,03	1,00

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO COMPARANDO AMBOS GRUPOS DE CARACOLES: INFECTADOS CON ESTADÍOS LARVARIOS DE *Fasciola hepatica* VERSUS NO INFECTADOS**

**Tabla 40: Prueba de Normalidad: Kolmogorov-Smirnov**

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	DE(1)	DE(2)
Condición	Proteína	Infectado	No infectado	36	36	25,28	31,64	9,73	10,75
Condición	AU	Infectado	No infectado	36	36	1,38	0,22	0,59	0,19
Condición	Urea	Infectado	No infectado	36	36	10,64	34,12	3,73	9,92

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	Mediana(1)	Mediana(2)	KS	p(2 colas)
Condición	Proteína	Infectado	No infectado	22,10	30,85	0,36	<0.02
Condición	AU	Infectado	No infectado	1,30	0,15	0,92	<0.01
Condición	Urea	Infectado	No infectado	10,43	33,58	0,97	<0.01

**Tabla 41: Comparación de medianas por la prueba de Wilcoxon para muestras independientes**

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	DE(1)	DE(2)
Condición	Proteína	Infectado	No infectado	36	36	25,28	31,64	9,73	10,75
Condición	AU	Infectado	No infectado	36	36	1,38	0,22	0,59	0,19
Condición	Urea	Infectado	No infectado	36	36	10,64	34,12	3,73	9,92

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	Mediana(1)	Mediana(2)	R-media(1)	R-media(2)	W	p(2 colas)
Condición	Proteína	Infectado	No infectado	22,10	30,85	30,22	42,78	1088,00	0,0109
Condición	AU	Infectado	No infectado	1,30	0,15	54,08	18,92	1947,00	<0,0001
Condición	Urea	Infectado	No infectado	10,43	33,58	18,58	54,42	669,00	<0,0001



**ANÁLISIS DE LA DOSIS LETAL MEDIA Y DOSIS LETAL 90 DEL LÁTEX DE  
*Euphorbia splendens***

**Tabla 42: Concentraciones del látex de *Euphorbia splendens* contra caracoles  
*Lymnaea sp.***

Concentración	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas	Residuos	Probabilidad
-1.000	15	0	.716	-.716	.048
-.699	15	1	.730	.270	.049
-.398	15	1	.947	.053	.063
-.222	15	2	1.525	.475	.102
-.097	15	4	2.389	1.611	.159
0.000	15	3	3.408	-.408	.227
.176	15	6	6.023	-.023	.402
.301	15	5	8.236	-3.236	.549
.398	15	10	9.932	.068	.662
.699	15	15	13.671	1.329	.911

**Tabla 43: Coeficientes estimados para la concentración del látex.**

Estimadores	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Concentración	3.156	.915	3.448	.001	1.362	4.950
Intersección	-0.884	.357	-2.477	.013	-1.240	-.527

$X^2$  de pearson= 6,660

Valor p=0,465

**Tabla 44: Estimaciones del nivel de concentración del látex contra caracoles.**

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para concentración		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior
,010	.349	.031	.698
,020	.426	.048	.795
,030	.483	.065	.865
,040	.531	.080	.921
,050	.574	.096	.970
,060	.613	.111	1.014
,070	.649	.127	1.054
,080	.684	.143	1.092
,090	.716	.159	1.127
,100	.748	.175	1.161
,150	.894	.263	1.315
,200	1.031	.361	1.456
,250	1.165	.473	1.595
,300	1.300	.599	1.738
,350	1.438	.743	1.892
,400	1.584	.905	2.065
,450	1.738	1.086	2.268
<b>,500</b>	<b>1.905</b>	<b>1.282</b>	<b>2.518</b>
,550	2.088	1.491	2.839
,600	2.292	1.705	3.269
,650	2.524	1.923	3.853
,700	2.793	2.145	4.662
,750	3.117	2.379	5.809
,800	3.521	2.639	7.508
,850	4.059	2.950	10.222
<b>,900</b>	<b>4.853</b>	<b>3.365</b>	<b>15.200</b>
,910	5.068	3.471	16.745
,920	5.311	3.588	18.608
,930	5.592	3.720	20.903
,940	5.924	3.872	23.810
,950	6.326	4.051	27.634
,960	6.834	4.271	32.934
,970	7.515	4.554	40.883
,980	8.526	4.957	54.538
,990	10.402	5.657	86.006