

## Veterinaria México

Volumen 37  
Volume

Número 1  
Number

Enero-Marzo 2006  
January-March

*Artículo:*

Detección del efecto del extracto del líquen de *Usnea florida* sobre la implantación y la fecundidad del estado adulto de *Trichinella spiralis* en ratones BALB/c

Derechos reservados, Copyright © 2006:  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

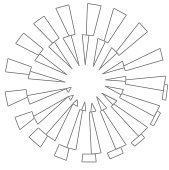
Otras secciones de  
este sitio:

- 📖 Índice de este número
- 📖 Más revistas
- 📖 Búsqueda

*Others sections in  
this web site:*

- 📖 *Contents of this number*
- 📖 *More journals*
- 📖 *Search*

# Detección del efecto del extracto del líquen de *Usnea florida* sobre la implantación y fecundidad del estadio adulto de *Trichinella spiralis* en ratones BALB/c



## Detection of the effect of *Usnea florida* lichen extract on the implantation and fertility of the adult stage of *Trichinella spiralis* in BALB/c mice

Enedina Jiménez-Cardoso\* María de Lourdes Caballero-García\* Roque Mateo González\*  
María del Rosario Chapa Ruiz\*\* Rosario Vázquez-Bravo\*\* Enrique Ángeles-Anguiano\*\*\*

---

### Abstract

The objective of this work was to analyze the *in vitro* effect of the antiparasitic properties of *Usnea florida* in the implantation and fertility of the adult parasite of *Trichinella spiralis* in murine mice. Five groups with four female BALB/c mice were made. Four groups were infected with *T. spiralis* larvae and three groups received oral treatment with 700 µg/mL of *Usnea florida* lichen extract, 50 mg/kg of albendazole and 4% dimethyl sulfoxide for three days. The fourth group was untreated and the fifth group was used as a negative control. Blood and small intestine samples were taken from every mouse to detect the presence of DNA from adult parasites and newborn *T. spiralis* larvae. Results showed a decrease of 66% of larvae implantation and a reduction of 43% in adult females fertility with an akinetic effect in the newborn larvae that did not migrate to the bloodstream. These results were confirmed by negative polymerase chain reaction test in blood from animals that were infected and treated with *Usnea florida*. In contrast, polymerase chain reaction was positive in the control group infected but not treated. These results suggested that *Usnea florida* can be used for treatment of this disease, since implantation of adult females is decreased and fertility is reduced, and newborn larvae are immobilized and cannot migrate to the bloodstream and lodge in muscle tissue.

**Key words:** *USNEA FLORIDA*, *TRICHINELLA SPIRALIS*, FECUNDITY, INHIBITION.

### Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antiparasitario *in vivo* del líquen *Usnea florida* sobre la implantación y fecundidad del gusano adulto de *Trichinella spiralis* mediante un modelo murino en ratón. Se formaron cinco grupos, cada uno con cuatro ratones hembras BALB/c. Cuatro fueron infectados con larvas de *Trichinella spiralis* y tres de ellos recibieron tratamiento vía oral durante tres días con el líquen *Usnea florida* a concentración de 700 µg/mL, albendazol a 50 mg/kg y dimetil-sulfóxido a 4%, respectivamente. El cuarto no recibió tratamiento y el quinto se usó como grupo testigo negativo sin infectar ni recibir tratamiento. De todos los animales se obtuvieron muestras de sangre e intestino delgado para detectar la presencia de ADN del parásito en los gusanos adultos y larvas recién nacidas de *T. spiralis*. Los resultados mostraron disminución de 66% en la implantación de larvas y reducción de 43% en la fecundidad de las hembras adultas con efecto acinético en las larvas recién nacidas que no pudieron pasar a torrente sanguíneo. Este efecto se confirmó con los resultados negativos de la reacción en cadena de la polimerasa en sangre de los ratones infectados y tratados con *Usnea florida*. En contraparte, la reacción en cadena de la polimerasa en el grupo testigo infectado, pero sin tratamiento farmacológico, fue positiva. Según lo anterior, se concluyó que *Usnea florida* es útil para el tratamiento de esa enfermedad al disminuir la implantación de adultos hembras y su fecundidad, y causar efecto inmovilizador en las larvas recién nacidas que les impidió su migración a la sangre y evitó la instalación de estas larvas en el músculo.

**Palabras clave:** *USNEA FLORIDA*, *TRICHINELLA SPIRALIS* INHIBICIÓN, FECUNDIDAD.

---

Recibido el 8 de abril de 2005 y aceptado el 11 de octubre de 2005.

\*Hospital Infantil de México "Federico Gómez", Laboratorio de Investigación en Parasitología, Dr. Márquez 162, Col. Doctores, 06720, México, D. F., Tel.: (52) 5588-4019, Fax: (52) 5588-4019. Correo electrónico: enedina@servidor.unam.mx

\*\*Laboratorio de Inmunoparasitología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Casco de Santo Tomás, México, D. F.

\*\*\*Laboratorio de Farmacología, Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, México

## Introduction

*Trichinella spiralis* is a nematode parasite that causes trichinellosis, a disease found in many mammals, including humans. Signs and symptoms are fever, oculopalpebral signs, myalgia and elevated eosinophils.<sup>1,2</sup> At the present time there is no adequate treatment to properly control this parasitic disease because the intestinal phase cannot always be diagnosed. During such phase the female copulates and newborn larvae are produced and disseminated causing the disease. Timely treatment is directly related to this intestinal phase as well as the severity of the infection<sup>3,4</sup>

The drugs that are commonly used against this parasite are pirantel, oxantel, thiabendazole, mebendazole and albendazole,<sup>5,6</sup> in an attempt to kill the parasite. However, the toxic antigen effect that follows death of the parasite is significant enough to warrant the need of anti inflammatory steroids.<sup>7</sup> Thus, new drugs are necessary for the early stage (called intestinal phase), to try to block the adult parasite and its fertility. When newborn larvae are reduced in number, they will not lodge in striated muscle.

Lichens are included among the herb products used in traditional and allopathic medicine. Specifically, the genus *Usnea* is the most commonly used. The clinical application of *Usnea florida* extract has been described in two ways, first as an antifungal and antibacterial agent, and secondly as an immunomodulator that increases the immunologic activity in some diseases such as pleuritis, tuberculosis and pneumonia. No contraindications or side effects have been reported, nor any interaction with other drugs.<sup>8</sup>

The anthelmintic activity of *Usnea florida* extract was shown in an experimental study with NIH mice<sup>9</sup> After six days of the infection, the lichen extract used at a dose between 350 and 700 µg/day decreased the implantation and fertility of the parasite in 63%. These preliminary data led to assume that similar effects might be found at shorter times, evaluating the implantation of the adult parasite and its fertility by examining the number of newborn larvae.

The objective of this research work was to analyze the effect of *Usnea florida* lichen extract on the implantation and fertility of the adult parasite *Trichinella spiralis* in BALB/c mice, extrapolating that the disease might be controlled and thereby submit a new treatment option for the parasitic infection.

## Material and methods

### **Obtaining the lichen extract**

The lichen *Usnea florida* was collected in the Llano

## Introducción

*Trichinella spiralis* es un nematodo parásito agente causal de triquinelosis, afecta a gran variedad de mamíferos, incluso al humano. Se caracteriza por síndrome febril, signos oculopalpebrales, mialgias y eosinofilia elevada.<sup>1,2</sup> Actualmente no existe tratamiento oportuno que limite esa parasitosis, pues no siempre puede diagnosticarse la fase intestinal, cuando la copula de la hembra permite la producción y diseminación de larvas recién nacidas y, con ello, el desarrollo de la enfermedad, de tal manera que el tratamiento oportuno está relacionado con esta fase y con la gravedad de la enfermedad.<sup>3,4</sup>

Los fármacos más útiles contra esta parasitosis son pirantel, oxantel, tiabendazol, mebendazol y albendazol,<sup>5,6</sup> que destruyen al parásito. Pero el efecto tóxico-antigénico que se produce con la muerte de éste es tan importante que propicia la necesidad de incorporar antiinflamatorios esteroidales.<sup>7</sup> Así, es sana la búsqueda de nuevos fármacos para la etapa temprana, o fase intestinal, con el propósito de bloquear el establecimiento y fecundidad del parásito adulto; la reducción del número de larvas recién nacidas traerá como consecuencia que éstas no se establezcan en el músculo estriado.

Entre los productos herbolarios usados en la medicina tradicional y alopática se incluyen líquenes, particularmente el género *Usnea* es el más utilizado. La aplicación clínica del extracto de *Usnea florida* se ha descrito en dos vertientes: una, como antimicótico y antibacteriano; otra, en la que se le atribuye capacidad inmunorreguladora incrementando la actividad del sistema inmunológico en algunas enfermedades, como pleuritis, tuberculosis y neumonía. No se han notificado contraindicaciones a efectos adversos ni interacciones con otros fármacos.<sup>8</sup>

La actividad antihelmíntica del extracto de *Usnea florida* se demostró en un estudio experimental con ratones NIH,<sup>9</sup> donde después de seis días a la infección, el empleo de una dosis entre 350 y 700 µg/día del extracto líquénico disminuyó la implantación y fecundidad del parásito a 63%. Estos datos supusieron que se podía observar efectos similares en tiempos más cortos, al evaluar la implantación del parásito adulto y la fecundidad de éste por el número de larvas recién nacidas depuestas.

El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto del extracto líquénico de *Usnea florida* sobre la implantación y fecundidad del parásito adulto de *Trichinella spiralis* en ratones de la cepa BALB/c, infiriendo que esto último permitirá controlar la enfermedad y, con ello, proponer un tratamiento alterno contra esa parasitosis

Grande region in the state of Mexico, Mexico. It was crushed and extracted with ethanol 96° at room temperature. The solvent was eliminated by reduced pressure percolation until a semisolid form was obtained which was dissolved in 1 mL DMSO at 4% to adjust the concentration to 700 µg/mL.

### **Animal infection and treatment**

Twenty eight to twelve-week-old female BALB/c rats were used with a mean weight between 20 and 25 g divided into five groups of four animals each. Every rat in the four groups was infected with 360 muscle larvae of *Trichinella spiralis* obtained from a rat infected with the parasite, after 30-35 days of infection and by artificial digestion. The first group was used as a positive control and was not given any treatment. The second, third and fourth group were given oral treatment with 700 g/day of lichen extract, 50 mg/kg of albendazole and dimethyl sulfoxide (DMSO) at 4%. The fifth group was considered a negative control and was neither inoculated nor treated. Blood was drawn from the distal tail vein from the five groups of rats on day 0, 3 and 5. *Trichinella spiralis* larvae were found by DNA amplification using PCR with the pPRA primers.<sup>10</sup>

### **DNA Extraction**

DNA was extracted from blood using the phenol-chloroform -isoamyl alcohol.<sup>11</sup> method. 100 µL of blood were resuspended in 300 µL of lysis buffer (0.15 M NaCl; 0.1M, EDTA; 0.5%, SDS; 0.1 mg/mL de proteinase k), incubated during 2h at 37°C and two extractions were done with phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1). The nucleic acids were precipitated with a volume of absolute ethanol and 0.1 mL of the total volume with sodium acetate 3 M pH 8.0. The DNA was precipitated after one hour at -20°C and recovered when 8000 g were centrifuged for 30 minutes. The RNA was eliminated after incubation with 20 mg/mL of RNAase at 37°C. A new DNA extraction was done with organic solvents with the above mentioned method. The DNA pellet was resuspended in TE buffer (10 mM tris-HCl; 1mM EDTA).

### **PCR in BALB/c mice blood**

For the development of this technique the following was used: 25 µL of a reaction mixture made of 2.5 µL buffer solution (10.0 mM tris-HCl; 50 mM KCl); 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>; 0.2 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTA); 1 M of pPRA<sup>10</sup> initiators: (+)5'CTTG TAAAGCGGTGGTGCCTA3'(-)3'CATAGAGGAGGC

## **Material y métodos**

### **Obtención del extracto liquénico**

*Usnea florida* fue colectado en Llano Grande, Estado de México, México, se molió y extrajo con etanol 96° a temperatura ambiente; por percolación a presión reducida, se eliminó el disolvente hasta obtenerlo en forma semisólida. Éste fue disuelto en 0.1 mL DMSO a 4% para ajustar la concentración a 700 g/mL.

### **Infección y tratamiento de animales**

Se utilizaron 20 ratones hembras BALB/c de ocho a 12 semanas de edad con peso promedio entre 20 y 25 g. Se formaron cinco grupos de cuatro animales cada uno. A cada ratón se le infectó con 360 larvas musculares de *Trichinella spiralis* obtenidas de músculo de rata infectada con el parásito, después de 30-35 días de infección por digestión artificial. El primer grupo sirvió como testigo positivo al que no se le administró nada. Al segundo, tercero y cuarto grupos se les administró, vía oral durante tres días, 700 g/día del extracto liquénico; albendazol, 50 mg/kg de peso; y dimetil-sulfóxido (DMSO) a 4%, respectivamente. Al quinto grupo se le consideró testigo negativo y no se inoculó ni administró nada. A los cinco grupos se les extrajo sangre de la vena región distal de la cola durante los días cero, tres y cinco. La presencia de larvas *Trichinella spiralis* se determinó con la amplificación de su ADN por reacción en cadena de la polimerasa con los iniciadores pPRA.<sup>10</sup>

### **Extracción de ADN**

La extracción de ADN de la sangre se realizó mediante el método fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.<sup>11</sup> Se resuspendieron 100 µL de sangre en 300 µL de amortiguador de lisis (0.15 M NaCl; 0.1M, EDTA; 0.5%, SDS; 0.1 mg/mL de proteinasa k). Se incubó durante 2 h a 37°C y se realizaron dos extracciones con fenol-cloroformo-alcohol-isoamílico (25:24:1). Los ácidos nucleicos fueron precipitados con un volumen de etanol absoluto y 0.1 mL del volumen total con acetato de sodio 3 M pH 8.0. El ADN fue precipitado después de una hora a -20°C y se recuperó al centrifugar a 8 000 g durante 30 min. El ARN fue eliminado después de incubarlo con 20 mg/mL de ARNasa a 37°C. Una nueva extracción del ADN fue realizada con solventes orgánicos mediante el procedimiento anterior. La pastilla de ADN fue resuspendida en amortiguador TE (10 mM tris-HCl; 1mM EDTA).

AACATTACCT3'; 500 µg of DNA obtained from blood and 0.3 µL of Taq polimerase (5 U/µL).\* The amplification program was: One 3 min cycle at 94°C, and 30 cycles (93°C of 1 min; 55°C of 1 min y 72°C of 3 min) plus an extension cycle of 8 min at 72°C. The amplified DNA fragments were separated in agarose gel at 1% using TAE IX as running buffer(0.04M tris-acetate; 100 mM EDTA) adding 5 µL of ethidium bromide (1 mg/mL). The gel was run at 80 volts during 45 minutes. For visualization 600 and 8000 pb UV bands were used.

### **Implantation and fertilization rates in the adult mice**

The implantation of the parasite was established after a seven day incubation period when the animals were sacrificed. The small intestine was dried to count the adult parasites using the Dennis *et al.* method.<sup>12</sup> The reproductive capacity of females was established by placing each one on a 96 well culture plate with 100 µl of RPMI 1640 medium,\*\* adding bovine fetal serum at 10 %\*\*\* and antibiotics: penicillin, streptomycin sulphate and Gentamicin sulphate at 10000 IU/mL; 10000 µg/mL y 500 g/µmL, respectively. The adult female parasites were incubated at 37°C during 48 h in a 5% CO<sub>2</sub> environment. Fertility was analyzed three times in 20 adult females, counting the number of newborn larvae produced by each adult female with a 10X inverted microscope. The procedure was repeated 5 times to determine the X and st in these assays. The "T" student test was used with the number of adults implanted as well as newborn larvae in animals treated with or without *Usnea florida* and/or albendazole, intending to find out if there was a statistically significant difference in implantation and fertility shown when the value was P < 0.05.

### **Results**

The lichen extract given at a 700 µg/day dose for three days after the infection led to a 66% decreased implantation rate of adult parasites, as shown in Table 1. The decrease was independent from the vehicle or diluent of the extract (DMSO at 4%) since with the latter a minimal 1.58% decrease effect was found on parasite implantation compared to positive controls. The PCR results (presence of larval DNA in blood from newborn mice) showed that the infected and untreated control animals were positive during days 3, 5 and 7, as well as when only the vehicle was given (DMSO at 4%), and negative in the animals that received antiparasitic treatment with *Usnea florida* lichen extract or albendazole (Table 1). The fertility of adult female parasites of *Trichinella spiralis* obtained

### **Reacción en cadena de la polimerasa de sangre de ratones BALB/c**

Veinticinco µL de mezcla de reacción con 2.5 µL de solución amortiguadora (10.0 mM tris-HCl; 50 mM KCl); 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0.2 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTA); 1 M de los iniciadores pPRA<sup>10</sup>: (+) 5'CTTGTAAGCGGTGGTGCGTA3' (-) 3'CATAGAGGAGGCAACATTACCT3'; 500 µg de ADN obtenido de la sangre y 0.3 µl de Taq polimerasa (5 U/µL).\* El programa de amplificación fue un ciclo a 94°C de 3 min y 30 ciclos (93°C de 1 min; 55°C de 1 min y 72°C de 3 min) más un ciclo extensión de 72°C de 8 min. Los fragmentos amplificados de ADN fueron separados en gel de agarosa al 1% con amortiguador de corrimiento TAE 1X (0.04M tris-acetato; 100 mM EDTA) adicionado con 5 µL de bromuro de etidio (1 mg/mL). El gel se corrió a 80 volts durante 45 minutos. Posteriormente se visualizó con los UV bandas de 600 y 800 pb.

### **Porcentaje de implantación y fecundación de la hembra adulta**

La implantación del parásito se determinó después del periodo de incubación de siete días en que los animales fueron sacrificados; se disecó el intestino delgado para contar a los gusanos adultos mediante el procedimiento de Dennis *et al.*<sup>12</sup> La capacidad reproductiva de las hembras fue determinada al colocar a cada una en una placa de cultivo de 96 pozos con 100 µL de medio RPMI 1640,\*\* adicionado de suero fetal bovino a 10%\*\*\* y antibióticos como penicilina, sulfato de estreptomycin y sulfato de gentamicina; a las concentraciones de 10 000 IU/mL; 10 000 µg/mL y 500 g/ mL, respectivamente. Los gusanos hembras adultos se incubaron a 37°C durante 48 h en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Por triplicado se analizó la fecundidad de 20 adultos hembra, determinando el número de larvas recién nacidas producidas por cada hembra; se utilizó un microscopio invertido con objetivo 10X. El procedimiento se realizó cinco veces para determinar el X y st de estos ensayos. Con cierto número de adultos implantados en los animales tratados con y sin *Usnea florida* o albendazol, así como con larvas recién nacidas se utilizó la prueba "t" de Student con el propósito de saber si había diferencia estadísticamente significativa en la implantación y fecundidad, esto se demostró cuando el valor fue de P < 0.05.

\*Perkin Elmer.

\*\*R-8755, sigma Chemical.

\*\*\*B-9433, sigma Chemical; G-P8306, sigma Chemical; S-0774, sigma Chemical; G-6896, sigma Chemical.



*in vitro* after 48 hours of culture and determined according to the number of newborn larvae showed a 43% decrease with the lichen extract as shown in Table 2. The decline in fertility was not influenced by the diluent of the extract, since a minimal 1.23% effect was seen. The validity of the tests was confirmed in group five (negative controls with no inoculation and no treatment) since the group results were negative.

## Discussion

The results with the *Usnea florida* lichen are consistent with reports from other investigators,<sup>9</sup> who found similar effects. However, we believe that our work has contributed with more significant findings because the treatment time was shorter, only three days, indicating that the antiparasitic effect occurred earlier and pointing to a clinical application. Even though, albendazole must be considered the most effective treatment, the concentrations already established and used of this agent were greater than those given with the extract. The dose of albendazole given to a 25 g mouse was 1 250 µg, and only 700 µg of the lichen extract was used, 44% less of *U. florida*. However, it was not possible to have equal doses. It must be remembered that the extract comes from lichen whose composition is unknown and previous studies showed that the dose used in our work was effective. The extract is promising because previous publications<sup>13</sup> indicate that it has no side effects nor cross reaction

## Resultados

El extracto líquénico administrado a dosis de 700 µg/día durante tres días posinfección, provocó reducción en la implantación de gusanos adultos del 66%, como se observa en el Cuadro 1. La disminución fue independiente del vehículo o diluyente del extracto (DMSO al 4%) ya que con éste se presentó un efecto mínimo de reducción de 1.58% sobre la implantación del parásito respecto del testigo positivo. Los resultados de PCR (presencia de ADN de larvas recién nacidas) en la sangre mostró que en animales testigos infectados sin tratamiento fueron positivos durante los días tres, cinco y siete, así como cuando se dio sólo el vehículo (DMSO a 4%) y fueron negativos en animales que recibieron tratamiento antiparasitario con extracto líquénico de *Usnea florida* o albendazol (Figura 1). La fecundidad de gusanos adultos hembras de *Trichinella spiralis* obtenida *in vitro* después de 48 horas de cultivo determinada por el número de larvas recién nacidas, disminuyó con el extracto líquénico en 43%, como se observa en el Cuadro 2. Esta reducción en la fecundidad tampoco se vio influida por el diluyente del extracto, pues con éste se observó un efecto mínimo de 1.23%. Con el grupo cinco, testigo negativo sin inocular y sin recibir tratamiento, se confirmó la validez de las pruebas, ya que los análisis hechos a este grupo fueron negativos.

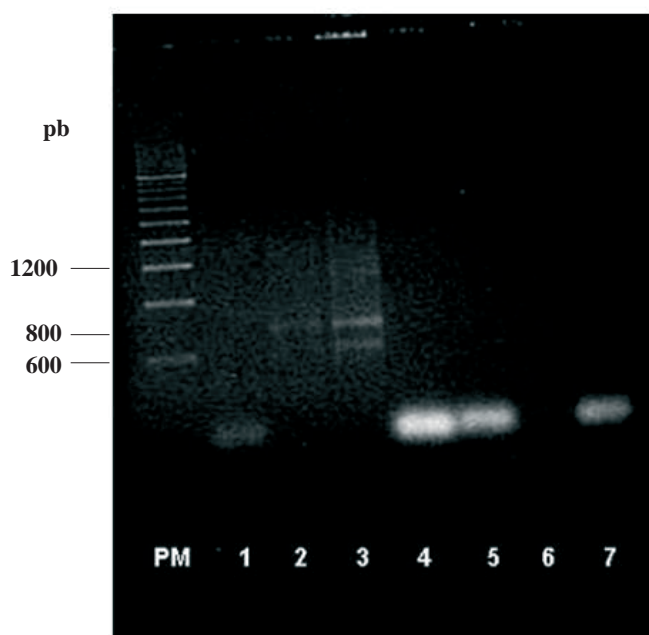
**Cuadro 1**

**EFFECTO DEL EXTRACTO LIQUÉNICO DE *Usnea florida* SOBRE LA IMPLANTACIÓN DE GUSANOS ADULTOS DE *Trichinella spiralis* EN EL INTESTINO DE RATÓN**

**EFFECT OF *Usnea florida* LICHEN EXTRACT ON THE IMPLANTATION OF ADULT *Trichinella spiralis* PARASITE IN MOUSE INTESTINE**

Treatment	Number of adult parasites /mouse		Decreased implantation rate	PCR (blood)
	(a)	( $\bar{X} \pm \sigma$ )		
Positive control	(a)	253±5.91	0	(+)
<i>Usnea florida</i> extract	(b)	86±3.46	66	(-)
DMSO vehicle at 4%	(c)	249±5.91	1.58	(+)
Albendazole	(d)	0%	100	(-)

Groups of four mice infected with 360 Muscle Larvae of *T. spiralis* and treated on days one, two and three post infection (pi); (a) Saline (ss); (b) 700 g/day of *U. florida* lichen extract; (c), extract vehicle (DMSO) at 4%; and (d) albendazole (50 mg/kg). The animals were sacrificed on day seven pi, and the adult parasites were counted and are representative of four experiments, PCR (polymerase chain reaction) according to Dick *et al.*<sup>10</sup> a, b: P<0.05; a, c: P>0.05 n.s.



**Figura 1.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% los productos de PCR en la sangre de ratones infectados con *Trichinella spiralis* tratados con el extracto liquénico *Usnea florida* y albendazol. PM; carril 1. Testigo negativo; carril 2 Testigo positivo, ratón después de tres días de infección con *T. spiralis*; carril 3. Ratón después de cinco días de infección con *T. spiralis*; carril 4. Ratón infectado después de tratamiento con albendazol; carril 5. Ratón infectado después de cinco días de tratamiento con albendazol.; Carril 6. Ratón infectado después de tres días de tratamiento con 700 µg de *Usnea florida*; carril 7. Ratón infectado después de cinco días de tratamiento con *U. florida*.

**Figure 1.** Agarose gel electrophoresis at 1%. PCR of blood products from mice infected with *Trichinella spiralis* treated with *Usnea florida* lichen extract and albendazole. PM; Lane 1. Negative control; Lane 2 Positive control, mouse after three days of *T. spiralis* infection; Lane 3. Mouse after five days of *T. spiralis* infection; Lane 4. Infected mouse after albendazole treatment; Lane 5. Infected mouse after five days of albendazole treatment, Lane 6. Infected mouse after three days treatment with 700 µg of *Usnea florida*; Lane 7. Infected mouse after five days treatment with *U. florida*.

**Cuadro 2**

EFFECTO DEL EXTRACTO LIQUÉNICO DE *Usnea florida* SOBRE LA FECUNDIDAD DE GUSANOS ADULTOS HEMBRA DE *Trichinella spiralis*

EFFECT OF *Usnea florida* LICHEN EXTRACT ON FERTILITY OF ADULT FEMALE *Trichinella spiralis* PARASITE

<i>Treatment</i>		<i>Number of nbl / female adult</i> $\bar{X} \pm \sigma$	<i>Decreased fertility</i> <i>rate</i>
Positive control	( a )	106.01 ± 1.0	100
<i>Usnea florida extract</i>	( b )	60.21 ± 3.88	43.2
DMSO vehicle at 4%	( c )	104.71 ± 2.10	1.23
Albendazole	( d )	0	0

Groups of four infected mice with 360 muscle larvae of *T. spiralis* and treated on day one, two and three post infection (pi); ( a ) with saline solution; ( b ) with 700 µg/day of *U. florida* lichen extract; (c) extract vehicle (DMSO) at 4%; and (d) albendazole (50 mg/kg), sacrificed on day 7 pi the newborn larvae (NBL) obtained were counted in culture plate wells and were representative of four experiments, PCR (polymerase chain reaction) according to (Dick *et al.*<sup>10</sup> (a) (b): P<0.05, (a) (c): P>0.05 n.s.

with other drugs as albendazole does.<sup>14,15</sup> Even though, it is true that in 58% of females fertility was not affected, it is assumed that the newborn larvae died at the time they migrated to the bloodstream. It is thought that the lichen extract was absorbed to the intestine through the mesenteric veins, and that the larvae were subjected to an akinetic effect that prevented them from passing to the blood explaining why they were not identified with PCR. The opposite happened with the infected animals that received no treatment for which the PCR reaction was positive during day 3 and 5, with two bands: a 600 and an 800 pb. Previous studies have shown that these amplification fragments are specific *T. spiralis*,<sup>10,16</sup> which confirms and supports our results.

Recent publications have reported a spermicide effect of *Usnea florida* crude extract,<sup>17</sup>. It is thought that the lichen effect is similar, inhibiting the fertility of adults and modifying the newborn larvae.

These results support an effect from the lichen extract on the implantation and fertility of the adult female parasites that prevents migration of the newborn larvae to the bloodstream. We conclude that this herbal product had a drug action in the intestine, as shown by a decreased implantation of larvae and fertility of the adult parasite, reducing the number of newborn larvae passing to the bloodstream. It is, therefore, thought that the lichen extract has a dual action: laminal and systemic, since it may possibly be absorbed, as has been already shown in other studies, having an analgesic and antiseptic effect.<sup>17,18</sup>

Even though it is true that other products such as *Lactobacillus casei* have shown to have an impact on *Trichinella spiralis* in BALB/c mice inducing an immunoprotective unspecific response, including IFN $\gamma$ , its antiparasitic effect has not been very significant, even though the parasite infection declined<sup>19</sup> for which, in a comparative manner, the lichen extract proved to have a greater antiparasitic effect because of its impact on the implantation and fertility of *T. spiralis*.

## Referencias

1. Dupouy-Camet J. Trichinellosis: a worldwide zoonosis. *Vet Parasitol* 2000;93:191-200.
2. Despommier DD, Weisbroth S, Fass C. Circulating eosinophils and trichinosis in the rat: the responsible for induction during infection. *J Parasitol* 1974; 60: 280-284.
3. Dzbenski TH, Bitkowska E, Plonka W. Detection of a circulating parasite antigen in acute infections with *Trichinella spiralis* diagnostic significance of findings. *Zentralbl Bakteriol* 1994; 281:519-525.
4. Anderson RC. Nematode parasites of vertebrates. Their development and transmission. CAB International UK. Wallingford, Oxon. 1992; 552-554.

## Discusión

Los resultados con *Usnea florida* coinciden con datos de otros investigadores,<sup>9</sup> quienes encontraron efectos similares; sin embargo, se considera que los resultados de este trabajo aportaron datos más significativos porque el periodo de tratamiento fue menor, tan sólo tres días, ello indica que el efecto antiparasitario se logró en forma temprana y se hace susceptible de aplicación en la clínica; en relación con el albendazol se debe considerar que si bien fue el fármaco más efectivo, las concentraciones utilizadas ya establecidas fueron mayores que las administradas con el extracto, pues para un ratón de 25 g la dosis de albendazol que se administró fue de 1 250  $\mu$ g, del extracto liquénico sólo se utilizaron 700  $\mu$ g, comparativamente 44% menos de *U. florida*. Sin embargo, no fue posible igualar estas dosis porque se debe recordar que el extracto proviene de un liquen cuya composición no se conoce y estudios previos demostraron que la dosis usada aquí era correcta .

Lo atractivo del compuesto es que se ha publicado<sup>13</sup> que no produce efectos adversos ni reacciones con otros fármacos, como el albendazol.<sup>14,15</sup> Si bien es cierto que en 58% de las hembras no afectó su fecundidad, se infiere que al pasar a sangre las larvas recién nacidas murieron, se cree que el extracto liquénico fue absorbido vía venas mesentéricas del intestino, que las larvas tuvieron un efecto acinético que no les permitió pasar a la sangre y esa fue la razón por la que no pudieron identificarse mediante PCR en la sangre, como contrariamente sucedió con los animales infectados que no recibieron fármaco donde esta reacción fue positiva durante los días tres y cinco, lo cual quedó demostrado por la PCR positiva con la presencia de dos bandas, una de 600 y otra de 800 pb; en previos estudios se ha demostrado que la presencia de estos fragmentos de amplificación son específicos para *T. Spiralis*,<sup>10,16</sup> ello permite apoyar y confirmar los resultados de este trabajo.

Recientemente se publicó el efecto espermicida del extracto crudo de *Usnea florida*,<sup>17</sup> por lo que se cree que el efecto del liquen se asemeja al inhibir la fecundidad de los adultos y modificando a las larvas recién nacidas.

Estos resultados apoyan que el extracto liquénico y el albendazol ejercieron un efecto sobre la implantación y fecundidad de los gusanos adultos hembras, evitando la migración de las larvas recién nacidas a la circulación sanguínea. Con lo anterior se concluye que este producto herbolario tuvo acción farmacológica en el nivel intestinal; ello quedó demostrado por la disminución en la implantación de las larvas y la fecundidad del gusano adulto dañando



5. Chug MS, Joo KH, Quan FSM, Kwon HS, Cho SW. Efficacy of flubendazole and albendazole against *Trichinella spiralis* in mice. *Parasite* 2001; 8:1955-198.
6. Sampbell WC, Cuckler AC. Effect of Thiabendazole upon the enteral and parenteral phases of Trichinosis in mice. *J Parasitol* 1965; 50:481-488.
7. Katzung BG. Basic and Clinical Pharmacology. In: Goldsmith, R.S, editor. *Antihelmints Pharmacology* Norwalk, Conneticut, USA: Appleton and Lange, 1995: 200-205.
8. Chapa MR, Montoya CJ, Pineda GG, Vazquez BR, Silvia TR. *In vitro* effect and *in vivo* effect of the *Usnea florida* extract on *Trichinella spiralis*. Magazine of Xth Internacional Meeting of Trichinellosis. 2001 August 20-24; Port Royal, France. France: Coching UFR, Becket D, 2001: 103.
9. Dick A, Lu TV, Ma K. The use of the polymerase chain reaction to identify Porcine isolates of *Trichinella*. *J Parasitol* 1992; 78:41-44.
10. Sambbook J, Fritsch E, Maniatics T. *Molecular Cloning. A laboratory Manual* 2<sup>nd</sup> ed. Cold New York, Spring Harbard Laboratory Press CSH. 1989.
11. Dennis DT, Despommier D, Davis NJ. Infectivity of new borne larva of *Trichinella spiralis* in the rat. Effect of usnic acid on the oxygen change properties of mesophyll cell protoplast from *Commelina communis*. *J Plant Phisiol* 1991;139:90-94.
12. Cabrera C. *Materia Médica, Usnea spp.* *Eur J Herbal Med* 1996;2:11-13.
13. Tracy JW, Webster LT. *Drugs used in the chemotherapy of helminths* 9<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill, 1996.
14. Silva-Torres R, Montellano-Rosales H, Castro-Mussot ME, Vázquez-Bravo R, Fonseca Favelat T, Ramírez-Pacheco C. Estudio fitoquímico del efecto espermaticida del extracto crudo de *Usnea florida*. *Memorias del XV Congreso Mexicano de Botánica.* 2001 octubre 14-19. Querétaro, México. Querétaro: Sociedad Botánica de México, 2000: 18.

y disminuyendo en número de larvas recién nacidas hacia el torrente circulatorio, por lo que se piensa que el extracto liquénico actúa en dos niveles: el laminal y el sistémico, ya que existe la posibilidad de que pueda ser absorbido, como ya se ha demostrado en otros estudios con efecto analgésico y antiséptico.<sup>17,18</sup>

Si bien es cierto que otros productos como el *Lactobacillus casei* han demostrado tener efecto sobre el establecimiento de adultos de *Trichinella spiralis* con ratones BALB/c, induciendo una respuesta protectora del punto de vista inmunoinespecífica, incluyendo IFN $\gamma$ , no ha resultado tan importante el aspecto antiparasitario aunque disminuyó la presencia del parásito,<sup>19</sup> a lo que comparativamente el extracto liquénico demostró una eficiencia mayor como antiparasitario al tener efecto en la implantación y fecundidad de *T. spiralis*.

---

Caballero-Garcia ML, Jimenez Cardoso E. Early detection of *Trichinella spiralis* infection by the polymerase chain reaction in blood samples of experimentally infected mice. *Parasite* 2000; 8:229-231.

16. Okuyama E, Umeyama K, Tamzaki M, Kinoshita Y, Yamamoto Y. Usnic acid diffractiaic acid analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*. *Planta Med* 1995;61:113-115.
17. Pereira EC. Analysis of *Usnea fasciata* crude extracts with antineoplastic activity. *Tokai J. Exp Clin Med* 1994;19:47-52.
18. Bautista-Garfias, Fernandez-Roman AR, Posadas-Beltran A, Ixtla-Rodriguez O. Establishment of *Trichinella spiralis* in BALB/c mice treated with *Lactobacillus casei* administered intra-peritoneal and orally. *Téc Pecu Méx* 2002;40:165-168.