



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
MORELOS

---

---

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE  
EXTRACTOS DE PLANTA SILVESTRE Y RAÍCES PILOSAS  
DE *Waltheria americana* Linn.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

BIOL. CARLOS ANDRÉS GARCÍA ARCE

DIRECTORA:

DRA. IRENE PEREA ARANGO



**CEIB**  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN  
EN BIOTECNOLOGÍA UAEM

CUERNAVACA, MOR.

MAYO, 2019.

# ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	3
2.1 Infecciones por nematodos gastrointestinales (NGI) .....	3
2.2 Antihelmínticos y sus mecanismos de acción.....	4
2.3 Fármaco resistencia .....	5
2.3.1 Resistencia a los antihelmínticos.....	5
2.3.1.1 Mecanismos de resistencia a antihelmínticos .....	6
2.4 <i>Haemonchus contortus</i> .....	7
2.5 Alternativas para la identificación de compuestos con actividad antihelmíntica provenientes de las plantas.....	8
2.5.1 Evaluación de especies vegetales sobre <i>H. contortus</i> .....	10
2.6 La biotecnología y su aplicación para la producción de compuestos bioactivos.....	11
2.7 <i>Waltheria americana</i> .....	13
2.7.1 Usos etnomédicos.....	14
2.7.2 Estudios fitoquímicos de <i>W. americana</i> .....	14
2.7.3 Estudios farmacológicos en <i>W. americana</i> .....	16
2.7.4 Estudios biotecnológicos en <i>W. americana</i> .....	17
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	19
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	20
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b> .....	20
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	21
6.1.1 Líneas de raíces pilosas (RP) .....	21
6.2 Medios de cultivo .....	21
6.2.1 Medio de mantenimiento de raíces pilosas (MMR) .....	21
6.3.2 Determinación de la curva de crecimiento de cultivos de RP de <i>W. americana</i> .....	21
6.4 Preparación de los extractos.....	22
6.5 Análisis fitoquímico de los extractos activos.....	23

6.5.1 Pruebas de reconocimiento de grupos fitoquímicos .....	23
6.5.2 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de <sup>1</sup> H .....	25
6.6 Obtención de germoplasma de <i>H. contortus</i> .....	25
6.6.1 Cuantificación de germoplasma y coprocultivo .....	25
6.6.2 Preparación del germoplasma de <i>H. contortus</i> .....	27
6.7 Estimación de la DL <sub>50</sub> en <i>H. contortus</i> .....	28
6.7.1 Efecto letal e inhibición de la motilidad con extractos de raíces pilosas y planta silvestre	28
6.7.2 Estimación de la DL <sub>50</sub> de los extractos de <i>W. americana</i> frente a <i>H. contortus</i> .....	29
6.8 Análisis estadístico para determinar el efecto letal y la DL <sub>50</sub> en <i>H. contortus</i> .....	30
6.9 Bioensayos <i>in vivo</i> para evaluar el efecto nematicida de extractos de diferente polaridad contra <i>H. contortus</i> en jerbos ( <i>Meriones unguiculatus</i> ) .....	31
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
7.1 Determinación de la curva de crecimiento de cultivos de las raíces pilosas de <i>W. americana</i> .....	33
7.2 Obtención de los extractos a partir de las hojas, raíces y líneas transformadas RPWa1 y RPWa2 .....	36
7.4 Determinación del efecto letal en <i>H. contortus</i> .....	37
7.5 Inhibición de la motilidad en L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i> .....	40
7.6 Determinación de la DL <sub>50</sub> de los extractos activos de <i>W. americana</i> frente a <i>H. contortus</i> .	42
7.7 Efecto nematicida del extracto hexánico de raíz, metanólico de hoja y diclorometánico de raíz contra <i>H. contortus</i> en jerbos ( <i>Meriones unguiculatus</i> ) .....	42
7.3 Análisis fitoquímico de los extractos hexánico de raíz y metanólico de hoja mediante reactivos de coloración/precipitación y RMN <sup>1</sup> H .....	43
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	<b>45</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	<b>48</b>
<b>10. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>49</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>50</b>

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida de <i>H. contortus</i> .....	8
<b>Figura 2.</b> Brote floral de <i>W. americana</i> .....	13
<b>Figura 3.</b> Cultivo de raíces pilosas en <i>W.americana</i> .....	18
<b>Figura 4.</b> Obtención de extractos mediante maceración secuencial .....	22
<b>Figura 5.</b> Técnica de McMaster .....	26
<b>Figura 6.</b> Técnica del embudo de migración larvaria (Baermann) a partir de cultivos fecales.....	27
<b>Figura 7.</b> Proceso de desenvaine de L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i> .....	28
<b>Figura 8.</b> Distribución de los extractos (50 mg/ml) y de los controles positivos y negativos (por triplicado) para determinar la mortalidad y la inhibición de la motilidad en <i>H. contortus</i> .....	29
<b>Figura 9.</b> Bioensayo para determinar la DL <sub>50</sub> .....	30
<b>Figura 10.</b> Variación de pH en RPWa1 y RPWa2 durante la cinética de crecimiento tipo lote de 42 días.....	33
<b>Figura 11.</b> Variación de la conductividad ( <i>mS</i> ) en el medio de cultivo a lo largo de la cinética de crecimiento.....	34
<b>Figura 12.</b> Variación del peso fresco (g) entre RPWa1 y RPWa2.....	35
<b>Figura 13.</b> Variación de peso seco (g) entre RPWa1 y RPWa2.....	35
<b>Figura 14.</b> Porcentaje de mortalidad del extracto hexánico a las 48 y 72 horas de evaluación contra larvas infectantes de <i>H. contortus</i> .....	38
<b>Figura 15.</b> Porcentaje de mortalidad del extracto diclorometánico a las 48 y 72 horas de evaluación contra larvas infectantes de <i>H. contortus</i> .....	38
<b>Figura 16.</b> Porcentaje de mortalidad del extracto metanólico y acuoso a las 48 y 72 horas de evaluación contra larvas infectantes de <i>H. contortus</i> .....	39
<b>Cuadro 1.</b> Estudios antihelmínticos de diferentes plantas contra <i>H. contortus</i> .....	10
<b>Cuadro 2.</b> Estudios fitoquímicos reportados en raíces y otros órganos de <i>Waltheria americana</i> .....	14
<b>Cuadro 3.</b> Rendimiento de extractos de plantas silvestres y raíces pilosas de <i>W. americana</i> .....	36

<b>Cuadro 4.</b> Porcentaje de la mortalidad de L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i> bajo diferentes extractos provenientes del cultivo <i>in vitro</i> y planta silvestre de <i>W. americana</i> .....	40
<b>Cuadro 5.</b> Porcentaje de inhibición de la motilidad de L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i> con diferentes extractos provenientes del cultivo <i>in vitro</i> y planta silvestre de <i>W. americana</i> .....	41
<b>Cuadro 6.</b> Reducción de la carga parasitaria en jerbos utilizando extractos de la planta silvestre...	43
<b>Cuadro 7.</b> Compuestos fitoquímicos identificados en los extractos activos de <i>W. americana</i> .....	43

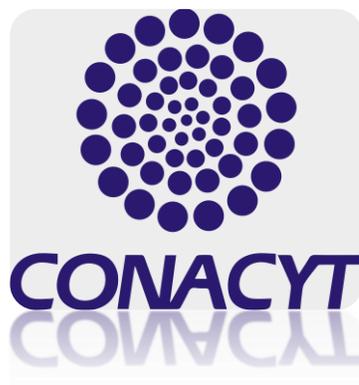
## ABREVIATURAS

---

BZ	Benzimidazoles
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
CL	Concentración letal
DL	Dosis letal
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EC	Concentración efectiva
E-Cato	Extracto <i>Castela tortuosa</i>
E-Cham	Extracto <i>Chenopodium ambrosioides</i>
GluCl <sub>s</sub>	Canales de cloro/ glutamato
GluCl	Cloro/ glutamato
HCl	Ácido clorhídrico
HPG	Huevos por gramo de heces
IMZ	Imidazotiazol
IVM	Ivermectina
J2	Juveniles segunda etapa
Kb	Kilo bases
LM	Lactonas macrocíclicas
L1	Larva estadio 1
L2	Larva estadio 2
L3	Larva estadio 3 (Infectante)
L4	Larva estadio 4 (joven-adulto)
L5	Larva estadio 5 (Adulto)
MMR	Medio de mantenimiento de raíces pilosas
nAChR	Receptores de acetilcolina nicotínicos
NaOH	Hidróxido de sodio
NGI	Nematodos gastrointestinales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
p-gp	p-glicoprotina
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de <sup>1</sup> H
Ri	Inductor de raíces
<i>rolB</i>	<i>Gen rolB</i>
RP	Raíces pilosas
T-DNA	ADN de transferencia
Tween 20	Polisorbato 20
UV	Ultravioleta
RPM	Revoluciones por minuto
RPWa1	Raíz pilosa de <i>Waltheria americana</i> línea 1
RPWa2	Raíz pilosa de <i>Waltheria americana</i> línea 2



Este proyecto fue realizado en el Centro de Investigación en Biotecnología a cargo de la dirección de la Dra. Irene Perea Arango en el laboratorio de Botánica Estructural de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, en colaboración con la Dra. María Eugenia López Arellano del laboratorio CENID-SAI, INIFAP.



Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca No. 824015.

## **DEDICATORIA**

A las personas que siempre han estado conmigo, quienes siempre me han apoyado de la manera más sincera, que son mis padres Efrén y Ma. Félix, que a pesar de las adversidades me han brindado en todo momento su apoyo moral y han sabido guiarme con sus consejos, de todo corazón mil gracias porque ustedes son la inspiración que yo tengo para hacer todo lo que hago y todo lo que soy.

A mis hermanos que, aunque no quieran están conmigo xD, especialmente a mi hermana Jacotey y a Mariana quienes me hacen pasar buenos momentos.

A Nataly, quien ha estado en las buenas y en las malas a mi lado, quien me ha acompañado a lo largo de mi carrera, te lo agradezco corazón.

## AGRADECIMIENTOS

Primero agradecer a dios, y a mis padres por el apoyo brindado en cada momento que lo necesité, por ser ese motorcito de impulso en cada decisión, muchas gracias.

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por el apoyo administrativo y por la estancia que me han brindado por todos estos años. Al Centro de Investigación en Biotecnología por permitirme mi desarrollo académico y por el apoyo en todos los aspectos durante la maestría.

A la Dra. Irene Perea Arango le agradezco por su apoyo, paciencia y conocimiento compartido durante este proyecto de maestría, y sobre todo la confianza que me tuvo y su amistad, muchas gracias.

A la Dra. María Eugenia López Arellano, gracias por el gran apoyo que mostro en todo momento durante el proyecto, por su asesoría y por acogerme en su laboratorio como uno más de sus estudiantes, mil gracias.

A la Dra. María del Carmen Gutiérrez, por su apoyo y sugerencias a lo largo de este proyecto.

A la Dra. María del Rayo, por su observaciones y sugerencias que fueron de importancia en este proyecto.

Al Dr. Alexandre Cardoso Taketa, quien me apoyo en la parte química, agradezco todas sus sugerencias y observaciones a lo largo de este proyecto.

Al Dr. Agustín Olmedo del CENID-SAI, INIFAP, quien me colaboró en los bioensayos y en el análisis estadístico, agradezco su disposición y paciencia.

Además, quiero agradecer al Biol. Julio Zajua y al Dr. Fabian Téllez del Bioterio del Instituto Nacional de Salud Pública, quienes me apoyaron y facilitaron los jerbos que utilizamos en el presente proyecto.

A la Técnico Lucero Valladares Cisneros, quien me apoyo de todas las formas posibles y por haber, por su atención y gentileza, muchas gracias.

A la Biol. Fernanda Cristina por el apoyo administrativo brindado y las facilidades otorgadas en los tramites de maestría.

Y por último y no menos importantes, quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio: Víctor Manuel, Karina, Manuel, Angélica, José Luis, Jorge M., Olivia, Gaby y Leticia, por hacer ameno el trabajo en el laboratorio. Y a mis amigos Kevin, Lenin, S. Andrew, Alfredo, Daniel B., Víctor y Manuel por esos buenos ratos compartidos a lo largo de esta etapa, saben de lo que hablo xD gracias locos.



## RESUMEN

Actualmente en la industria pecuaria el control de nematodos gastrointestinales se ha basado principalmente en el uso de fármacos antihelmínticos, sin embargo, algunos de estos generan residuos en los productos animales de consumo humano como la carne y la leche, tienen un impacto ecológico negativo y su uso intensivo ha desencadenado la resistencia antihelmíntica en poblaciones de parásitos. Es por esta razón, que, en los últimos años, se ha incrementado la búsqueda de nuevos compuestos antihelmínticos en fuentes naturales como son las plantas medicinales. Sin embargo, la producción de compuestos bioactivos a partir del material vegetal puede variar dependiendo de la localidad, condición ambiental y estado de desarrollo de la planta. Es por ello que, el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una alternativa prometedora para la producción de compuestos bioactivos, particularmente, el cultivo de raíces pilosas y células en suspensión. Por lo anterior, en el presente trabajo se caracterizaron cultivos *in vitro* de raíces pilosas de *Waltheria americana* y evaluaron extractos de diferente polaridad provenientes de planta colectada en campo y cultivos de raíces contra larvas L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub> de *Haemonchus contortus* en ensayos *in vitro* e *in vivo*, respectivamente.

En las pruebas *in vitro*, en un periodo de incubación de 72 horas, el mayor efecto antihelmíntico lo presentó el extracto hexánico de raíz silvestre con un  $62.15 \pm 9.68\%$  seguido del metanólico de hoja con un  $48.51 \pm 10.07\%$  de mortalidad de larvas L<sub>3</sub>, ambos aplicados a una concentración de 50 mg/ml, al parecer la inhibición de la motilidad está relacionada con la mortalidad en este estadio larvario, ya que observamos el  $31.25 \pm 8.01\%$  de inhibición de la motilidad con el extracto hexánico de raíz y del  $39.65 \pm 5.5\%$  con el metanólico de hoja. Por otra parte, los extractos obtenidos a partir de las líneas de raíces pilosas tuvieron un menor efecto sobre las L<sub>3</sub>, el máximo valor de mortalidad se observó en el extracto hexánico de la línea RPWa2, la cual alcanzó el  $14.38 \pm 3.44\%$ .

Los resultados *in vivo* confirman las propiedades nematocidas de *W. americana* observadas en los ensayos *in vitro*, ya que los extractos obtenidos de la planta redujeron significativamente ( $p < 0.05$ ) la población de larvas L<sub>4</sub> en un modelo de jerbo. El extracto hexánico de raíz y el metanólico de hoja, fueron los más efectivos al disminuir la carga parasitaria hasta el 59.4% y 46.6%, respectivamente. La presente investigación cimienta las bases para la identificación y purificación de los compuestos responsables de la actividad nematocida *W. americana*, y el desarrollo de nuevas drogas para el control de enfermedades parasitarias en pequeños rumiantes.

## 1. INTRODUCCIÓN

Hace algunos años, la gamma de antihelmínticos comerciales de origen químico eran suficientes para el control de las parasitosis producidas por nematodos. Como resultado de su uso inadecuado (antihelmínticos innecesarios, dosis incorrectas, periodos de uso muy prolongados, etc.), los parásitos han desarrollado resistencia a muchos de estos productos, siendo un problema que va en aumento ocasionando serias consecuencias en el sector pecuario, afectando la salud y la producción animal. Por ejemplo, en Sudamérica se ha observado disminución en la ganancia diaria de peso de hasta el 50% en bovinos bajo situaciones de reinfección continua, producto del pastoreo directo, lo anterior provocado por infecciones mixtas de nematodos resistentes a drogas de larga duración como la ivermectina (IVM) (fármaco antihelmíntico). Por otra parte, el mercado de productos cárnicos también se ve afectado por el efecto residual de algunos de estos fármacos antihelmínticos en los productos, por ejemplo, la detección de residuos de IVM en embarques hacia Estados Unidos procedentes de Brasil, puso en riesgo la posición del país sudamericano como mayor exportador mundial de carne bovina, en un intento de mantener su mercado internacional, Brasil ha prohibido la producción, importación, comercialización y uso de todas las drogas consideradas como lactonas macrocíclicas de larga acción (Anziani y Fiel, 2015). Es por ello que la resistencia antihelmíntica constituye una amenaza a la producción y consumo de alimentos de origen animal libres de patógenos y residuos antiparasitarios en la industria pecuaria (Cantón *et al.*, 2017).

En los últimos años, ha aumentado el interés en la búsqueda de nuevos compuestos con capacidad antihelmíntica a partir de productos naturales. Las plantas medicinales son una de las principales fuentes de nuevos compuestos bioactivos, sin embargo, la producción de estos, derivados del metabolismo secundario de la planta puede variar dependiendo de la localidad, condición ambiental y estado de desarrollo del material colectado. Es por ello que estrategias biotecnológicas, como el cultivo *in vitro*, surgen como una alternativa para la producción estable y controlada de compuestos bioactivos, al ser una metodología independiente de las condiciones medioambientales. Además, la composición metabólica y por ende los efectos farmacológicos de los cultivos *in vitro* han resultado ser similares e incluso superiores a los de la planta intacta como se ha reportado para *Agapanthys praecox*, *Drimia robusta* y *Catha edulis* (Kumari *et al.*, 2015); característica que ha permitido la identificación de nuevos compuestos bioactivos.

*Waltheria americana* Linn es una especie vegetal que ha despertado interés médico debido a su uso en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades infecciosas, entre las que destacan su uso para el tratamiento de la diarrea, disentería, acabar con parásitos intestinales, entre otras afecciones intestinales (Monroy-Ortiz y Castillo-España 2007). Los estudios farmacológicos empleando raíces de esta especie han demostrado actividad antibacteriana frente a cepas Gram positivas y Gram negativas (Maheswara *et al.*, 2006; Olajuyigbe *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2009; Mongalo *et al.*, 2012; Dimayuga y García, 1991), actividad antitripanosómica (Cretton *et al.*, 2015), y actividad antifúngica contra hongos del género *Candida*, *Aspergillus* y

*Saccharomyces*. A su vez, se han realizado estudios fitoquímicos demostrando la producción de metabolitos secundarios posibles responsables de su actividad biológica como son: saponinas, alcaloides, triterpenos, flavonoides, flavonas, taninos, fenoles, glucósidos cardiacos, terpenos entre otros (Olajuyigbe *et al.*, 2011; Maheswara *et al.*, 2006).

La colecta de raíces de la planta silvestre para el estudio y producción de extractos o compuestos puros pone en riesgo a las poblaciones naturales de *W. americana* y contribuye al empobrecimiento de la biodiversidad nacional, es por ello que en nuestro laboratorio se han desarrollado protocolos para la obtención de cultivo de raíces pilosas (*hairy roots*) y células en suspensión de esta especie. El cultivo *in vitro* de raíces pilosas (RP) ha demostrado en diversos trabajos su utilidad para la obtención de compuestos con mayores rendimientos en comparación con la planta silvestre, e incluso la síntesis de nuevos metabolitos secundarios gracias a su estado de diferenciación, estabilidad genética y bioquímica, aunada a una tasa rápida de crecimiento que permiten la producción de una gran cantidad de biomasa en medios libres de reguladores de crecimiento (Georgiev *et al.*, 2015; Ghorbani *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2014; Akhgari *et al.*, 2015).

Por lo anteriormente expuesto, en el presente proyecto de investigación se plantea evaluar la actividad antihelmíntica contra *Haemonchus contortus*, nematodo de rumiantes utilizando los extractos provenientes de plantas silvestres y cultivos de raíces pilosas de *W. americana*.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Infecciones por nematodos gastrointestinales (NGI)**

Las enfermedades parasitarias son uno de los mayores problemas para la industria pecuaria a nivel mundial, repercutiendo en la salud y producción animal. Particularmente los nematodos gastrointestinales (NGI) de rumiantes como bovinos y ovinos, son de gran importancia ya que estos patógenos causan problemas severos de inflamación al invadir el tejido y romperlo, ya sea por acción mecánica o enzimática para adquirir alimento necesario en su desarrollo y permanencia en el abomaso (estómago verdadero de rumiantes), el intestino grueso y delgado. Generalmente todos los animales en pastoreo presentan problemas NGI, cuando la carga parasitaria es baja no existe efecto negativo importante en la salud, sin embargo, a medida que la carga va en aumento se observan diferentes síntomas como: una disminución en el peso provocada por la falta de apetito, diarrea y anemia (Mekkonen, 2007), en casos agudos pueden causar la muerte en individuos jóvenes, o en individuos adultos permanece como un problema crónico afectando la productividad de los animales. Entre los principales nematodos del tracto gastrointestinal están los géneros *Haemonchus*, *Ostertagia/Teladorsagia*, *Cooperia*, *Oesophagostomum*, y *Trichostrongylus*. A la fecha, los antihelmínticos son el único método de control para este tipo de infecciones parasitarias, sin embargo, la resistencia a estos fármacos (en su mayoría) está

causando severos problemas de salud y hasta la fecha, no se cuentan con otras alternativas eficaces. La introducción de otro tipo de control, como los compuestos bioactivos derivados de las plantas, podrá contribuir a la identificación de nuevas moléculas con actividad antihelmíntica para mejorar la salud animal y contar con alimentos inocuos para el ser humano (Moreno *et al.*, 2010).

## 2.2 Antihelmínticos y sus mecanismos de acción

En los países en desarrollo algunas de las especies de NGI provocan altos índices de mortalidad, especialmente en pequeños rumiantes, principalmente en animales jóvenes, y en aquellos cuyo sistema inmune se encuentra comprometido. Actualmente los productores utilizan tres clases de antihelmínticos importantes que ejercen sus efectos en canales iónicos, enzimas, proteínas estructurales y moléculas de transporte (Köhler, 2001). Estos fármacos antihelmínticos se dividen de acuerdo con su mecanismo de acción y estructura química: **(I)** las Lactonas Macrocíclicas (LM) como ivermectina (IVM), doramectina, eprinomectina y moxidectina; **(II)** el grupo de Tetrahidropirimidinas/Imidazotiazoles (IMZ), que incluye levamisol y tartrato de morantel; y **(III)** la familia de Bencimidazoles (BZ), que incluye principalmente los fármacos febendazol, oxfendazol y andalbendazol (Encalada *et al.*, 2014).

### I) Lactonas Macrocíclicas (LM)

Se ha demostrado que el sitio de acción de estos fármacos es una familia de canales de cloro regulados por glutamato específicos de invertebrados (GluCl<sub>s</sub>) que contienen subunidades de tipo  $\alpha$ . Actúan como agonistas del glutamato aumentando los tiempos de apertura del receptor provocando corrientes de iones cloruro seguido de hiperpolarización de la membrana celular y parálisis muscular somática bloqueando a su vez el bombeo de la faringe, consiguiendo una inhibición de la alimentación del parásito. Por lo tanto, la verdadera actividad nematicida se da mediante la interrupción de la actividad de ingestión y finalmente inanición (Köhler, 2001).

En este grupo se incluyen dos productos aprobados para su aplicación subcutánea ivermectina (0.2 mg/kg de peso corporal), y una mezcla de avermectinas y moxidectina (0.2 mg/kg de peso corporal). Otros derivados de las LM para su uso en ganado son eprinomectina y doramectina (Köhler, 2001).

## **II) Tetrahidropirimidinas/Imidazotiazoles (IMZ)**

En este grupo se incluyen a las tetrahidropirimidinas pirantel y morantel, así como al levamisol un IMZ. Estos productos actúan como agonistas de la acetilcolina, se ha demostrado que la superficie de las células musculares de los nematodos posee receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChR) que pueden activarse por estos fármacos. Debido a la unión antihelmíntico-receptor excitador, se produce una parálisis espástica del músculo del nematodo, impidiendo su sobrevivencia y estancia dentro de su hospedero (Köhler, 2001).

## **III) Bencimidazoles (BZ)**

Son antihelmínticos de amplio espectro, algunos de los más importantes son mebendazol, flubendazol, fenbendazol, oxfendazol, oxibendazol, albendazol, tiabendazol, tiofanato, febantel, neobimin y triclabendazol. Sin embargo, solo el albendazol y fenbendazol han sido aprobados para su uso en animales domésticos, pequeños y grandes rumiantes, equinos, animales de compañía etc. El principal modo de acción de este grupo de antihelmínticos se centra en su capacidad bioquímica de unirse con alta afinidad y de forma pseudo-irreversible a la proteína de la subunidad de microtúbulos,  $\beta$  de la tubulina, alterando así la estructura y funciones de los microtúbulos inhibiendo la formación de estos (Köhler, 2001).

Los primeros estudios sobre el efecto de los BZ demostraron afectaciones sobre las células intestinales en nematodos, coincidiendo con la desaparición de microtúbulos citoplasmáticos provocando una redistribución de vesículas citoplasmáticas y otros orgánulos. Sugiriendo una inhibición del transporte de vesículas secretoras mediado por estos en los tejidos de absorción del helminto, siendo las enzimas digestivas liberadas las responsables del daño tisular observado (Köhler, 2001).

A pesar de que existen gran variedad de antihelmínticos disponibles, el uso constante y abusivo, así como la subdosificación, han propiciado la aparición de nematodos multi-resistentes a los tratamientos convencionales poniendo en riesgo la eficacia de los sistemas de control de parásitos en pequeños rumiantes.

## **2.3 Fármaco resistencia**

### **2.3.1 Resistencia a los antihelmínticos**

La resistencia a los antihelmínticos es uno de los mayores problemas para el control efectivo de las parasitosis por nematodos amenazando tanto la economía de los agricultores como el bienestar animal (Wolstenholme *et al.*, 2004). La resistencia se presenta cuando un gran número de parásitos tolera una mayor dosificación de un producto en comparación con una población normal

de la misma especie. Existen varios mecanismos de resistencia que involucran desde cambios en el sitio blanco molecular, cambios en el metabolismo logrando inactivar o desechar el producto químico, un cambio en la distribución de la droga en el organismo blanco evitando así que esta pueda acceder a su sitio de acción, o la amplificación de genes blanco para superar la acción de la droga (Wolstenholme *et al.*, 2004).

### **2.3.1.1 Mecanismos de resistencia a antihelmínticos**

Las poblaciones de NGI tienen características genéticas que favorecen el desarrollo de resistencia a los antihelmínticos. Entre las más importantes, la rápida tasa de evolución de la secuencia de nucleótidos y el gran tamaño de las poblaciones de parásitos, que les confiere un alto nivel de diversidad genética (Rodríguez *et al.*, 2015).

La base bioquímica de resistencia parasitaria es muy importante para el estudio y formulación de nuevos compuestos antihelmínticos. Actualmente se conoce el mecanismo de resistencia a algunos antihelmínticos más comunes dentro del grupo de las LM, BZ e IMZ (Köhler, 2001).

#### **Resistencia a Bencimidazoles**

Los parásitos resistentes a BZ se caracterizaron por la pérdida de la afinidad de los fármacos a los sitios de unión en la proteína beta-tubulina de la subunidad  $\beta$  de los microtúbulos. Estudios genéticos muestran que esta resistencia se asocia con la mutación puntual en un gen del isotipo 1 de la  $\beta$  tubulina. También se observaron mutaciones puntuales en codones 167 y 200 (TTC a TAC) y 198 (GAA a GCA). Mostrando correlación total entre la resistencia a BZ y la sustitución del aminoácido de la fenilalanina por tirosina en la posición 200 en el gen de la  $\beta$  tubulina en varios aislados evaluados de *Haemonchus* (Encalada *et al.*, 2014).

#### **Resistencia a Tetrahidropirimidinas/IMZ**

Se conoce que los mecanismos bioquímicos de resistencia a este grupo de antihelmínticos son de tipo múltiple, sin embargo, se ha observado que los mecanismos son muy parecidos a los de los BZ donde se alteran los sitios diana de unión al fármaco. Ensayos con *H. concortus* resistente a levamisol, demostraron que la unión del fármaco al nAChR es de menor fuerza que en aislados susceptibles. Esto se debe a mutaciones en genes que codifican la subunidad nAChR que se asociaron con la unión deficiente a receptores o con propiedades modificadas. Aunque el número de receptores es similar tanto en poblaciones resistentes y susceptibles cuando se analizaron a concentraciones de fármaco quimioterapéutico estimadas, los parásitos resistentes contenían menor número de canales activos en comparación con los sensibles. Lo que sugiere una desensibilización de los receptores a la unión del fármaco en nematodos resistentes (Köhler, 2001).

## Resistencia a Lactonas Macroíclicas

El mecanismo molecular de resistencia a LM aún sigue siendo un tema de amplia investigación. Sin embargo, hay algunos avances genéticos donde se ha observado que las alteraciones en varios loci genéticos están asociados con esta resistencia. Por ejemplo, se demostró en *Caenorhabditis elegans* un alto grado de divergencia de secuencia en la región codificante de la subunidad  $\alpha$  del gen *glc-1*. Esta variación observada en *glc-1* confiere resistencia a las avermectinas. Otros estudios genéticos de *C. elegans* también han revelado que la delección de tres genes de la subunidad del canal GluCl (*avr-14*, *avr-15* y *glc-1*) da como resultado una pérdida de sensibilidad a ivermectina y moxidectina. Por otro lado, en *H. contortus* se observó que una sustitución de alanina por valina en la posición 169 de la subunidad  $\alpha$  de GluCl se asoció con una baja sensibilidad de la ivermectina (Whittaker *et al.*, 2016). Así mismo, el incremento en la expresión del transportador de membrana, la p-glicoprotina (p-gp) está asociado al fenotipo de resistencia entre diversas cepas de campo de nematodos, entre ellos, *H. contortus* (Berk *et al.*, 2016).

### 2.4 *Haemonchus contortus*

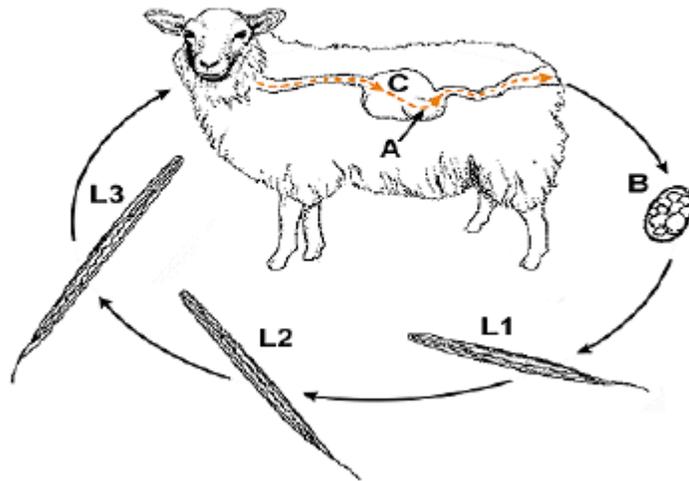
En todo el mundo, *H. contortus* es uno de los NGI más dañinos que causan grandes pérdidas económicas debido a su patogenicidad y prevalencia principalmente en pequeños rumiantes como ovejas y cabras. Su distribución es mundial, aumentando el riesgo de pérdidas económicas en zonas tropicales y subtropicales; por ejemplo, en Sudamérica donde la actividad de ganado ovino y caprino es intensiva se han reportado porcentajes de mortalidad de 25 a 35 % respectivamente. Además, la disminución en la producción de carne, leche y lana es un problema que afecta a varios países; en Argentina se ha documentado una disminución de ganancia de peso en ovinos de hasta un 40%, y una reducción de producción de leche y lana de hasta un 10% (Javitt *et al.*, 2013).

Debido a su hábito hematófago, genera grandes daños a poblaciones de ovinos y caprinos jóvenes y adultos. *H. contortus* puede causar anemia severa por la acción de alimentarse continuamente de sangre del hospedador mientras que una baja conversión alimenticia es observada en animales en producción y frecuentemente alta mortalidad en animales jóvenes (Munguía *et al.*, 2013). *H. contortus* es un nematodo que pertenece al orden Strongylida, los adultos miden de 2 a 3 cm, cuenta con un diente o lanceta en su cavidad oral para perforar la mucosa gástrica y adquirir nutrientes. El hábito de hematofagia le da al helminto un intestino rojizo, además, los machos muestran una bolsa copulatoria bien desarrollada, mientras que las hembras generalmente tienen cubierta supra vulvar, las hembras son extremadamente prolíficas llegan a poner 5000 huevos / día, y se excretan junto con las heces del hospedero (Angulo *et al.*, 2007).

El ciclo de vida es directo, una vez que los huevos son excretados al ambiente, bajo condiciones de humedad y temperatura adecuadas estos eclosionan a larvas (L) y pasan por procesos de desarrollo conocidos como L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> y larva infectante (L<sub>3</sub>), este proceso tiene lugar en un periodo de 6-7 días. Los animales adquieren la infección al ingerir L<sub>3</sub> que se encuentra en el pasto. Una vez

ingerida, la L<sub>3</sub> llega a su hábitat definitivo, el abomaso, invade tejido y muda al cuarto estadio (L<sub>4</sub>), primer estadio hematófago por aproximadamente 15 días. Posteriormente, migra a la luz de la mucosa gástrica como L<sub>5</sub> adulto joven, para madurar sexualmente y copular. El período prepatente varía entre 15 y 18 días en condiciones normales (figura 1), (Angulo *et al.*, 2007).

### **Haemonchus - Ciclo de vida**



**Figura 1.** Ciclo de vida de *H. contortus*. A: Abomaso, B: huevo, C: Rumen. Colin Johnstone, 1998.

### **2.5 Alternativas para la identificación de compuestos con actividad antihelmíntica provenientes de las plantas**

En la actualidad los problemas de salud animal y el desarrollo de resistencia antihelmíntica, cada vez más acelerada por parte de lo NGI a muchos fármacos de nueva generación, han logrado centrar la atención en el desarrollo e identificación de compuestos bioactivos alternativos provenientes de plantas. Los vegetales constituyen un amplio campo en la investigación farmacológica con grandes posibilidades para llegar al conocimiento de nuevas drogas. Las plantas medicinales estudiadas a través de la farmacognosia elaboran en su metabolismo una serie de metabolitos secundarios como fenoles, terpenos, alcaloides y demás, que poseen propiedades antihelmínticas que los convierten en herramientas útiles para el control de parasitosis por NGI (Maregiani *et al.*, 2010).

Entre los metabolitos que destacan por su capacidad antihelmíntica encontramos a los compuestos fenólicos, de manera general muchos de los extractos ricos en taninos tienen diferente efecto en el ciclo de vida del nematodo. Los taninos hidrolizables y condensados son la clase de polifenoles que han sido más intensamente investigados con respecto a su actividad antihelmíntica. Este efecto ha sido confirmado en diferentes investigaciones en modelos *in vivo* e *in vitro* contra un amplio rango de NGI o de vida libre (Spiegler *et al.*, 2017). Algunos flavonoides, saponinas, alcaloides, terpenoides, hidrocarburos, cumarinas y terpenos han sido reportados con eficiencia antihelmíntica, ya sea afectando la producción de huevos, la fecundidad, o bien teniendo un efecto letal sobre algún estadio larvario de los parásitos. Los metabolitos secundarios que están asociados a una disminución de la fecundidad, producción y eclosión de huevos en NGI son: terpenoides (carvacol, timol, limoneno), hidrocarburos ( $\beta$ -coriofileno, P-cimeno, canfor, linalol,  $\alpha$ -pineno) (Munguía *et al.*, 2013), taninos condensados (Paolini *et al.*, 2003), alcaloides y saponinas (Poné *et al.*, 2009), carvona (Oka *et al.*, 2000) entre otros. También se ha reportado actividad importante sobre larvas infectantes en metabolitos glucosilados (quercitrina y arbutina), catequina y epicatequina y otros polifenoles más (Hernández *et al.*, 2017), flavonoides (quercetina y rutina) (García *et al.*, 2005) y terpenoides (Maregiani *et al.*, 2010). Recientemente se informó sobre la actividad nematicida de tres alcaloides de quinolona: la waltheriona E, waltheriona A y la 5'-metoxiwaltheriona A, de *Triumfetta grandidens* contra juveniles de segunda etapa (J2s) de *Meloidogyne incognita*, un fitopatógeno de importancia agrícola, en experimentos en macetas, mostrando una reducción significativamente de la formación de agallas en las raíces del tomate (Jang *et al.*, 2015). Así mismo, se ha documentado en otro trabajo la actividad de tres waltherionas identificadas como: 5'-metoxiwaltheriona A, waltheriona A y waltheriona C provenientes del extracto de raíces de *W. americana*, confrontados con nematodos del nudo de raíz (*Meloidogyne incognita*, *M. hapla*, *M. arenaria*) y el nematodo de la madera del pino (*Bursaphelenchus xylophilus*) en ensayos *in vitro* (Jang *et al.*, 2019).

Aunque el mecanismo de acción de estos metabolitos aún no está dilucidado, su efecto se puede asociar a su toxicidad por ingestión o por contacto, que al igual que los antihelmínticos comerciales producen cambios en el metabolismo del parásito provocando su muerte (Isman, 2006). La investigación continua de metabolitos secundarios de las plantas contribuye a la identificación de futuros compuestos antihelmínticos que pueden amenazar el avance acelerado de la resistencia parasitaria, disminuir el impacto ecológico negativo y los altos costos de tratamientos de estas parasitosis.

### 2.5.1 Evaluación de especies vegetales sobre *H. contortus*

Existen actualmente varios trabajos donde se ha evaluado la actividad de diferentes especies vegetales contra *H. contortus*, mostrando respuestas positivas contra diferentes etapas de vida, así como el efecto en la fecundidad y reproducción del parásito (cuadro 1). De esta manera se corrobora el uso antiparasitario, contra la diarrea y afecciones estomacales, atribuidas popularmente a estas plantas medicinales (Koné *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2010). Los resultados de estos trabajos indican que los metabolitos secundarios como compuestos polifenólicos presentes en *Morus alba*: flavonoides (quercetina y rutina), cumarinas (umbeliferona), fenoles simples (resveratrol), saponinas y alcaloides tienen una actividad antihelmíntica considerable en las larvas L<sub>3</sub> (García *et al.*, 2005). En *Cucurbita moschata* los principios activos responsables de la actividad podrían ser los metabolitos secundarios tales como compuestos de aminoácidos, saponinas o compuestos terpenoides presentes en los extractos (Marie *et al.*, 2008). Los taninos, un grupo ampliamente estudiado por su importante actividad antihelmíntica, también están relacionados con la alta actividad de *Arachis pintoi*, *Gliricidia sepium* y *Cratylia argentea* (Son-de Fernex *et al.*, 2012). Además, se ha investigado acerca del efecto de aceites esenciales de *Origanum vulgare*, mostrando que una sola dosis de orégano molido tiene potencial como alternativa natural para controlar *H. contortus* en ovinos de pelo criados en México (Munguía *et al.*, 2013) (cuadro 1). Cabe mencionar que existe un estudio en *Waltheria lanceolata*, una especie del mismo género que nuestra planta de estudio, donde se observó actividad larvicida (CL<sub>100</sub> a una concentración de 0.43 mg/ml del extracto etanólico de hoja a los 6 días de evaluación contra *H. contortus*, sin realizarse análisis fitoquímico (Koné *et al.*, 2005).

**Cuadro 1.** Estudios antihelmínticos de diferentes plantas contra *H. contortus*.

Especie vegetal	Parte de la planta	Extracto	Compuesto fitoquímico	Resultado	Referencia
<i>Morus alba</i>	Hojas, pecíolos y tallos	Acuoso crudo y acuoso fraccionado	Flavonoides, cumarinas fenoles simples saponinas y alcaloides.	Mortalidad superior al 80% al cabo de 60 minutos y llegó a ser de 96% a los 120 minutos.	García <i>et al.</i> , 2005
<i>Waltheria lanceolata</i>	Hojas	Etanólico	N/E	La actividad larvicida (CL <sub>100</sub> ) a una concentración de 0.43 mg/ml a los 6 días de evaluación.	Koné <i>et al.</i> , 2005
<i>Prosopis laevigata</i> y <i>Bursera copallifera</i>	Hojas y tallos	Hexano, acetona, etanol y metanol	N/E	El extracto hexánico de <i>P. laevigata</i> produce una mortalidad del 86% a las 72 hrs y en combinación con el extracto acetónico de <i>B. copallifera</i> se logró el 66% de mortalidad en el mismo tiempo de evaluación.	Lopez-Aroche <i>et al.</i> , 2008
<i>Cucurbita moschata</i>	Semillas	Acuoso, metanólico y diclorometano	Saponinas, cucurbitacina B curcubitina, derivados de	Afectan el desarrollo larvario. En gusanos adultos después de 24 horas el extracto acuoso inhibe la motilidad 92.1% de las larvas.	Marie <i>et al.</i> , 2008

			aminoácidos y terpenoides.		
<i>Callitris endlicheri</i> , <i>Casuarina cunninghamiana</i> , <i>Acacia spp.</i>	Hojas	Metanólico	N/E	La inhibición de la migración larval	Moreno <i>et al.</i> , 2010
<i>Origanum vulgare</i>	Hojas y partes aéreas	N/E	Aceites esenciales	Reducción de la carga parasitaria en ensayos <i>in vivo</i> .	Munguía <i>et al.</i> , 2013
<i>Chenopodium ambrosioides</i> y <i>Castela tortuosa</i>	Partes aéreas: hojas y tallos	Hexánico: E-Cham: extracto de <i>Chenopodium ambrosioides</i> E-Cato: extracto de <i>Castela tortuosa</i>	N/E	La mortalidad <i>in vitro</i> se obtuvo con el extracto de E-Cham (96.3%) a 40 mg/ml, seguido de E-Cato (78.9%) a 20 mg/ml ambos después de 72 h. El efecto combinado más alto (98.7%) se obtuvo después de 72 h a 40 mg/ml. En el ensayo <i>in vivo</i> , E-Cato y E-Cham redujo la carga parasitaria en jerbos un 27.1% y 45.8%, respectivamente. La eficacia aumentó a 57.3% cuando los extractos se administraron combinados.	Zamilpa <i>et al.</i> , 2018
Cinco plantas leguminosas tropicales.	Hojas	Acetona/agua (70:30)	Compuestos polifenólicos/taninos	<i>Cratylia argentea</i> presentó una inhibición completa del desvainado a 1200 µg/ml y una inhibición de la migración larval del 72.5% a 150 µg/ml.	Son-de Fernex <i>et al.</i> , 2012

\* N/E: No evaluado

## 2.6 La biotecnología y su aplicación para la producción de compuestos bioactivos

En muchas ocasiones los compuestos bioactivos se han obtenido por extracción química directa de las plantas, sin embargo, este procedimiento es difícil debido a las bajas concentraciones (µg/kg de material) en las que se expresan. El cultivo *in vitro* ha permitido la producción de material vegetal en condiciones controladas y axénicas para el estudio de los metabolitos secundarios. La síntesis de algunos compuestos está asociado a células especializadas por lo que resulta muy útil el cultivo del órgano completo (generalmente raíces y brotes), estos se caracterizan por tener un patrón metabólico similar al de la planta de donde se obtuvo inicialmente (Arias *et al.*, 2008).

Un gran porcentaje de estos fitoquímicos de interés farmacológico se encuentran exclusivamente en la raíz de las plantas y es de gran interés su estudio bioquímico, por lo que puede ser de utilidad la implementación de un sistema de cultivo *in vitro* para su investigación. Entre los metabolitos de interés farmacológico que se producen y acumulan en sistemas radiculares se puede mencionar al alcaloide camptotecina que se usa como un anticancerígeno y antiviral que se produce en las raíces de *Camptotheca acuminata* y algunas otras especies de la familia *Apocynaceae*, *Olacaceae* y *Rubiaceae* (Lorence *et al.*, 2004). Los ginsenoides considerados los componentes activos más

importantes en raíces de *Panax ginseng* con actividad cardioprotector, inmunomodulador, anti-fatiga, y hepato-protector fisiológico (Yu *et al.*, 2005). Cabe citar a los alcaloides, saponinas y flavonoides con actividad antimicrobiana, analgésica y antiinflamatoria en las raíces de *Waltheria americana* (Olajiyigbe, 2011; Mohammed, 2007; Zongo *et al.*, 2013) entre otras especies más.

Dentro de los sistemas de cultivo *in vitro* para el estudio o producción de metabolitos secundarios destacan las raíces pilosas o *hairy roots*, estas se obtienen mediante la infección con *Agrobacterium rhizogenes*, una bacteria del suelo Gram (-) que transfiere de manera natural parte de su material genético a diversas especies vegetales, provocando una proliferación de raíces adventicias en el sitio de infección. *A. rhizogenes* alberga un plásmido llamado Ri (inductor de raíces) de alrededor 200 kb que contiene una región conocida como T-DNA que es el sector que se transfiere a las células vegetales y se integra de manera estable en el genoma de la planta (Chandra, 2012). Este T-DNA está constituido por dos bordes de 25 pb cada uno: el borde izquierdo y borde derecho (T<sub>L</sub>-DNA y T<sub>R</sub>-DNA, respectivamente) que contienen a su vez los genes responsables del desarrollo de raíces pilosas en las plantas infectadas. Se demostró que los productos de expresión alteran los niveles y la producción de las fitohormonas en las células transformadas, de manera que la integración del T-DNA en el genoma huésped resulta en el desarrollo descontrolado y neoplásico de células transformadas en el sitio de infección, dando lugar a raíces transformadas con crecimiento ilimitado (Wahby, 2007).

El cultivo de raíces pilosas tiene varias ventajas en comparación a los órganos sin transformar, he incluso en comparación con otros sistemas de cultivo *in vitro* (cultivo de callos y suspensiones celulares), entre las cuales se encuentra un crecimiento relativamente rápido con un periodo de crecimiento menor (corto tiempo de duplicación) y con una acumulación de altos niveles de metabolitos secundarios en las células vegetales según su fase de crecimiento (Bivadi *et al.*, 2014), además de presentar alta estabilidad bioquímica y genética su cultivo es relativamente fácil y no necesita fitorreguladores para generar biomasa, disminuyendo los costos de producción. Por estas razones el cultivo de raíces pilosas es una alternativa rentable para la producción en masa de un amplio número de metabolitos secundarios y la expresión de proteínas (Georgiev *et al.*, 2015).

Las raíces pilosas representan una valiosa herramienta de ingeniería basadas en la transferencia horizontal de genes mediante el T-DNA en el plásmido Ri ya sea silvestre o recombinado (Makhzoum *et al.*, 2013). Lo que abre la posibilidad de aplicaciones en diferentes campos como la ingeniería genética y metabólica para la producción de metabolitos secundarios y proteínas recombinantes para la industria de la salud, la fitoremediación y la agricultura molecular (Bivadi *et al.*, 2014).

## 2.7 *Waltheria americana*

*Waltheria americana* (syn. *Waltheria indica*) es una planta herbácea de la familia Malvaceae, crece en áreas de vegetación perturbada, o suelos empobrecidos. Es una hierba erecta o postrada, con las hojas gruesas, más largas que anchas con pelos suaves, nervaduras muy hundidas, el borde con dientes suaves o marcados. Las flores son aromáticas, amarillas y están agrupadas en ramilletes que nacen de las axilas de las hojas. Los frutos son en cápsulas con una semilla de 2 mm de diámetro (CONABIO, 2015; Atlas de la medicina tradicional mexicana, 2009).

### Clasificación Taxonómica

- Reino: Plantae
- Subreino: Traqueobionta
- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Orden: Malvales
- Familia: Malvaceae
- Género: *Waltheria*
- Especie: *Waltheria americana* Linn.



**Figura 2.** Brote floral de *W. americana*

Esta planta está ampliamente distribuida en zonas tropicales y subtropicales, asociada a bosque tropical caducifolio y subcaducifolio, matorral xerófilo, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña, bosques de encino y de pino. En México está ampliamente distribuida en los estados de Aguascalientes, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Colima, Durango, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (CONABIO, 2015).

### **2.7.1 Usos etnomédicos**

Esta planta es conocida comúnmente como escobillo blanco, malva, babo de araña, escobillo batán, mazote de caballo, hierba del soldado, malva de monte y tapacola. Por su distribución cosmopolita y el fácil acceso que se tiene a la planta, *W. americana* ha sido utilizada en Hawai, este, oeste y sur de África, en la India y en algunas partes de América del sur para el tratamiento de diferentes enfermedades (Zongo *et al.*, 2013). En México se preparan infusiones a partir de hojas y raíces para aliviar la bronquitis, afecciones estomacales y la diarrea provocada por disentería (Hernández, 2009; Leonti *et al.*, 2001) y además la utilizan en decocción para tratar el cáncer (Dimayuga *et al.*, 1987), en Nigeria las hojas se utilizan como tónico de la sangre. En Hawai se utiliza para el dolor de garganta infecciones pulmonares y el asma (Leonard, 2006). La planta completa se bebe como té o jugo para combatir las úlceras gástricas y se usa contra la inflamación (Taveira *et al.* 2009; Rao *et al.*, 2005). En Jamaica y la India se mastica la raíz para tratar hemorragias internas (Mitchell y Ahmad, 2006). En Burkina Faso la usan para tratar la diarrea, el dolor de ojos y la tos (Zerbo *et al.*, 2007) y utilizan las partes aéreas en decocción para tratar la malaria (Jansen *et al.*, 2010). Para la hinchazón del cuerpo, especialmente abdomen cara y piernas (Flatie *et al.*, 2009). La corteza de la raíz se usa masticada o en infusiones para el dolor de garganta y la planta entera se toma en infusión contra la artritis, neuralgia, resfriado común, tos, flema bronquial o mucosa, diarrea, fatiga, asma, oftalmia, dolor de estómago, úlceras de la piel, sífilis, y como anticonceptiva (abortiva) (Borokini y Omotayo, 2012; Mohammed *et al.*, 2007; Reginald, 2009).

### **2.7.2 Estudios fitoquímicos de *W. americana***

Los compuestos químicos encontrados en *W. americana* se han aislado a partir de extractos de diferente polaridad provenientes de hojas, tallos, raíces o incluso la planta completa mostrando diferencias en cuanto a la constitución química de cada órgano de la planta (Cuadro 2) (Olajiyigbe *et al.*, 2011; Maheswara *et al.*, 2006).

**Cuadro 2.** Estudios fitoquímicos reportados en raíces y otros órganos de *Waltheria americana*.

<b>Extractos evaluados</b>	<b>Compuestos identificados</b>	<b>Parte de la planta</b>	<b>Referencia</b>
Diclorometo	Alcaloides de quinolina: 8-deoxoantidesmona, waltheriona (E- L), vanesina y antidesmona.	Raíces	Cretton <i>et al.</i> , 2014
Hidroalcohólico, diclorometano/metanol	Flavonoides: epicatequina	Raíces	Zongo <i>et al.</i> , 2013
Acuoso	Alcaloides, saponinas, flavonoides, taninos, hidratos de carbono y esteroides.	Raíz, tallo y hoja	Mohammed <i>et al.</i> , 2007
Diclorometano	Alcaloides, flavonoides, derivados triterpénicos,	Raíces y partes aéreas	Monteillier <i>et al.</i> , 2017
Metanol, acuoso; fracciones: n-hexano, cloroformo, n-butanol, metanol y agua.	Saponinas, alcaloides, taninos, flavonoides, esteroides, glucósidos cardiacos	Hojas	Igwebuike <i>et al.</i> , 2017
Acuoso	Taninos, flavonoides, esteroides, triterpenos, saponinas, compuestos reductores y cumarinas	Tallos	Youbare <i>et al.</i> , 2016
Cloroformo y n-butanol	Flavonoides: tilirosido, quercetina y epicatequina	Toda la planta	Rao <i>et al.</i> , 2005
Diclorometano	Polihidroximetoxiflavonoides: Oxianina A, vitexicarpina, crisosplenol E, flindulatina, 5-hydroxy-3,7,4'-trimethoxyflavone y seis alcaloides de quinolona: waltheriona (M-Q).	Partes aéreas	Cretton <i>et al.</i> , 2016

### 2.7.3 Estudios farmacológicos en *W. americana*

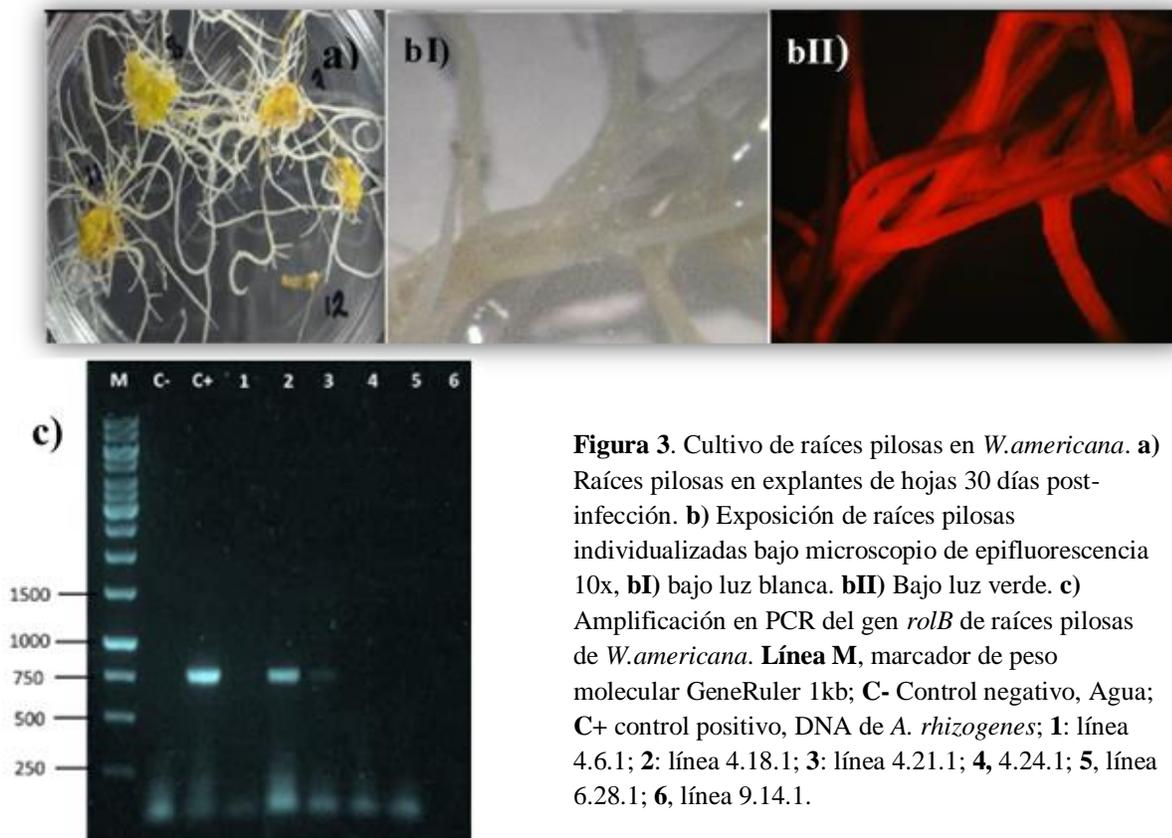
Los metabolitos presentes en las plantas medicinales generalmente son los responsables de las actividades biológicas que se les atribuyen. *W. americana* no es la excepción, el conjunto de compuestos sintetizados en sus órganos han llamado la atención de los investigadores. El efecto analgésico ha sido evaluado con interesantes resultados; Yougbare *et al.*, (2016), demostraron la actividad analgésica del extracto acuoso de tallos a una concentración de 300 mg/kg de peso corporal en un 54%, mientras en el extracto acuoso de raíz se obtuvo una actividad analgésica máxima a 20 mg/kg de peso corporal (Mohammed *et al.*, 2007). Se ha observado también la inhibición del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) en la prueba antioxidante, utilizando extracto etanólico, hexánico y acuoso, este último mostrando inhibición en un 74.31% (Garba *et al.*, 2012; Yougbare *et al.*, 2016). Sin dejar de lado la actividad antitripanosómica (Cretton *et al.*, 2014; Cretton *et al.*, 2015), antiplasmodial (Jansen *et al.*, 2010), neuro-protectora y anticonvulsiva (Mundo *et al.*, 2015, 2017), contra el asma y la inflamación (Zongo *et al.*, 2013; Rao *et al.*, 2005), sedante y anticonvulsiva (Hamidu *et al.*, 2008). Sin duda una de las actividades más ampliamente estudiadas es la actividad antimicrobiana donde se han obtenido importantes resultados (Olajuyigbe *et al.*, 2011; Osman *et al.*, 2013; Garba *et al.*, 2012). En cuanto a la actividad antihelmíntica hay un solo reporte (Jang *et al.*, 2019) donde se evaluó la actividad del extracto metanólico y de tres alcaloides de 4-quinolona identificados como: 5'-metoxiwalthersonia A, walthersonia A y walthersonia C provenientes del mismo extracto de raíces de la planta silvestre, confrontados a nematodos del nudo de raíz (*Meloidogyne incognita*, *M. hapla*, *M. arenaria*) y el nematodo de la madera del pino (*Bursaphelenchus xylophilus*) en ensayos *in vitro*. Los resultados mostraron una actividad del extracto metanólico del 100% a una concentración de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  después de 72 h de exposición y un valor de  $\text{EC}_{50} / 72\text{h}$  de 122.8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en juveniles de la segunda etapa ( $J_2$ ) de *M. incognita*. En cuanto a los metabolitos evaluados, la 5'-metoxiwalthersonia A y walthersonia A mostraron actividad nematocida muy fuerte 72 h después de la exposición, con valores de  $\text{EC}_{50}$  que oscilaron entre 0.09 y 1.74  $\mu\text{g / mL}^{-1}$  contra los juveniles de *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* y *Bursaphelenchus xylophilus*, mientras que la walthersonia C solo exhibió una actividad nematocida significativa contra los nematodos del nudo de la raíz. Adicionalmente, se realizaron evaluaciones en macetas y en campo. En los experimentos en macetas, la aplicación de una formulación de polvo humectable del extracto de acetato de etilo de *W. indica* (*W. indica*-WP20) a 26.7, 53.4 y 106.8 mg a.i.  $\text{kg}^{-1}$  de suelo redujo significativamente la formación de agallas y masas de huevos en las raíces de las plantas de tomate de forma dosis dependiente. Además, la aplicación de 20 mg a.i. por planta *W. indica*-WP20 redujo efectivamente la formación de agallas en las raíces de las plantas de melón y la densidad de población del nematodo en el suelo en comparación con el control sin tratar en condiciones de campo. Este trabajo de *W. americana* demuestra la capacidad nematocida de las raíces de plantas silvestres frente a fitonematodos así como el potencial para utilizar tanto el extracto crudo y los compuestos aislados como control botánico en sistemas agrícolas convencionales (Jang *et al.*, 2019). Sin embargo, la actividad antihelmíntica de *W. americana* frente a NGI de interés pecuario no había

sido investigada hasta nuestra presente propuesta, dicho estudio se basa en el potencial de la planta para la identificación de moléculas con actividad antihelmíntica de amplio rango.

#### **2.7.4 Estudios biotecnológicos en *W. americana***

Se han reportado estudios acerca de la inducción al cultivo de callos y suspensiones celulares y el uso de estos cultivos para el estudio sobre la liberación del neurotransmisor GABA que está relacionada a la actividad analgésica, sedante, neuroprotectora y anticonvulsiva (Mundo *et al.*, 2015; 2017). También se han desarrollado cultivos de raíces pilosas (RP), mediante el establecimiento de un protocolo fiable, las RP fueron producto de la infección de explantes de hoja con la cepa ATCC 15834/ pTDT RNAi de *Agrobacterium rhizogenes* (García, 2016).

A continuación, se describe brevemente la metodología empleada para la obtención de las RP: explantes de hojas obtenidas a partir de plántulas axénicas de 2 semanas de edad fueron infectadas con la cepa bacteriana ATCC 15834/ pTDT RNAi de *Agrobacterium rhizogenes*. Después de 48 h de cocultivo la bacteria fue eliminada utilizando 400 mg/L de cefotaxima y ceftriaxona, treinta días post-infección se registró un 100% de transformación de los explantes. La expresión de la proteína rojo fluorescente y la amplificación del gen *rolB* mediante PCR permitieron confirmar la transformación genética (figura 3). Sin embargo, no se han realizado estudios sobre los factores que afectan el crecimiento de las raíces, contenido metabólico y actividad biológica (García, 2016).



**Figura 3.** Cultivo de raíces pilosas en *W.americana*. **a)** Raíces pilosas en explantes de hojas 30 días post-infección. **b)** Exposición de raíces pilosas individualizadas bajo microscopio de epifluorescencia 10x, **bI)** bajo luz blanca. **bII)** Bajo luz verde. **c)** Amplificación en PCR del gen *rolB* de raíces pilosas de *W.americana*. **Línea M**, marcador de peso molecular GeneRuler 1kb; **C-** Control negativo, Agua; **C+** control positivo, DNA de *A. rhizogenes*; **1:** línea 4.6.1; **2:** línea 4.18.1; **3:** línea 4.21.1; **4,** 4.24.1; **5,** línea 6.28.1; **6,** línea 9.14.1.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente la resistencia antihelmíntica es un problema mundial de interés en la producción animal, así como también de salud pública, que está poniendo en peligro la eficacia y el tratamiento de una serie de enfermedades parasitarias, cada vez mayor, provocadas por NGI resistentes. Por esta razón, es importante desarrollar investigaciones en diferentes áreas del conocimiento como la biotecnología que permitan la identificación de nuevos compuestos bioactivos, así como el desarrollo de sistemas para su producción.

Las raíces de *Waltheria americana* son empleadas en la medicina tradicional morelense para el control de la diarrea y afecciones estomacales. El efecto antibacteriano, antifúngico y antitripanosómico de los extractos de esta especie ya han sido demostrados (Olajiyigbe, 2011; Cretton *et al.*, 2016; Cretton *et al.*, 2014; Cretton *et al.*, 2015), sin embargo, se desconoce su potencial como posible agente de control de infecciones provocadas por NGI, por lo que el objetivo de esta propuesta es determinar el efecto antihelmíntico de *W. americana*.

Con base a los diversos reportes que indican que los cultivos de raíces pilosas mantienen la capacidad biosintética de la planta que le dio origen, se espera que los metabolitos secundarios presentes en la planta silvestre de *W. americana* se conserven en las raíces cultivadas, y el posible efecto antihelmíntico se mantenga. La información generada en esta propuesta contribuye a la identificación de nuevas fuentes de compuestos útiles para el control de NGI.

#### **4. HIPÓTESIS**

Los extractos elaborados a partir de plantas silvestres y raíces pilosas de *Waltheria americana* poseen actividad antihelmíntica frente al nematodo gastrointestinal *Haemonchus contortus*.

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la actividad antihelmíntica *in vitro* e *in vivo* de extractos de plantas silvestres y raíces pilosas de *W. americana* en contra del nematodo hematófago de rumiantes, *Haemonchus contortus*.

##### **5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Comparar la actividad antihelmíntica *in vitro* de extractos de diferente polaridad de raíces pilosas y plantas silvestres de *W. americana* frente al parásito de rumiantes *Haemonchus contortus*.

Comparar la actividad antihelmíntica *in vivo* de extractos de diferente polaridad de raíces pilosas y plantas silvestres de *W. americana* frente al parásito de rumiantes *Haemonchus contortus*, utilizando como modelo experimental jerbos (*Meriones unguiculatus*).

Caracterizar químicamente los extractos con actividad antihelmíntica derivados de los cultivos de raíces pilosas de *W. americana*.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1.1 Líneas de raíces pilosas (RP)**

Líneas de raíces pilosas *RPWa1* y *RPWa2*, fueron establecidas con anterioridad en nuestro grupo de trabajo en el Laboratorio de Botánica Estructural y han sido subcultivadas en medio de mantenimiento de raíces pilosas (MMR) (García, 2016).

## **6.2 Medios de cultivo**

### **6.2.1 Medio de mantenimiento de raíces pilosas (MMR)**

Medio MS (Murashigue y Skoog, 1962), adicionado con 3% de sacarosa como fuente de carbono y 0.1 g/L mio-inositol, el pH se ajustó a  $5.7 \pm 0.1$ . El medio se esterilizó en autoclave (*Vertical pressure steam sterilizer* FT1175) a 121 °C por 20 minutos.

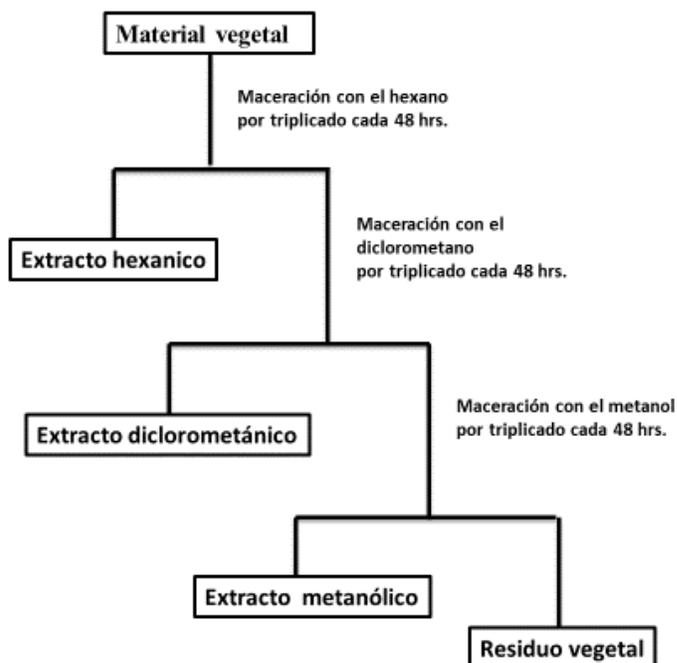
### **6.3.2 Determinación de la curva de crecimiento de cultivos de RP de *W. americana***

La cinética de crecimiento se determinó mediante el cultivo de las líneas de raíces pilosas (*RPWa1* y *RPWa2*) en medio MMR donde se monitoreó el aumento de la biomasa reflejada en el peso fresco y peso seco, variación de pH y conductividad. Se utilizó como inóculo inicial aproximadamente 0.5 g de raíces pilosas (peso fresco), el cultivo se inició en frascos con un volumen nominal de 250 ml con tapa hermética, y con un volumen de trabajo de 40 ml del medio MMR.

Se realizaron 7 puntos de muestreo durante el ciclo de crecimiento con 3 réplicas en cada punto a lo largo de 6 semanas, para lo cual se cultivaron 21 frascos, sacrificando tres frascos tomados aleatoriamente por punto de muestreo, las condiciones anteriores fueron las mismas para ambas líneas. El procesamiento de cada muestra se realizó de la siguiente manera: se tomó la biomasa de los cultivos procurando escurrir la mayor cantidad posible de medio en el frasco, posteriormente en un disco de papel filtro previamente pesado se colocaron en un dispositivo de filtración (embudo Büchner montado en un matraz kitasato de 500 mL, el cual se conectó a una bomba de vacío), posteriormente con el sistema de vacío encendido se hizo pasar la totalidad de la muestra y se filtró durante 5 min, posteriormente se determinó el peso fresco de la biomasa, seguido de la determinación del pH y la conductividad del medio recuperado, estos últimos parámetros fueron tomados con un conductímetro (Orion105). La biomasa de raíces pilosas se colocó a temperatura ambiente para su secado total y obtener el peso seco de la misma.

## 6.4 Preparación de los extractos

El material vegetal seco y triturado proveniente de hojas (50 g), raíces (40 g), y las líneas RPWa1 (14 g) y RPWa2 (6 g), fue sometido a maceraciones en una relación 1:10 (p/v) con 3 solventes orgánicos de diferente polaridad: hexano, diclorometano y metanol durante un periodo de 48 horas por triplicado (figura 4). Una vez filtrados los extractos a través de papel filtro, fueron colocados en campana de extracción para la evaporación completa de los solventes.



**Figura 4.** Obtención de extractos mediante maceración secuencial.

El rendimiento para cada extracto se calculó considerando el peso total del material vegetal utilizado para la maceración (100%) y la cantidad de extracto resultante, de esta manera el rendimiento neto del extracto es un porcentaje del material vegetal total, explicado mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Extracto} * 100}{M. vegetal T.}$$

Donde:

**Extracto:** cantidad de extracto (g) obtenido posterior a la maceración.

**M. vegetal T:** Cantidad de material vegetal (g) total utilizado para la maceración.

## 6.5 Análisis fitoquímico de los extractos activos

El aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios presentes en las plantas, es de gran importancia, ya que, al conocer la naturaleza de los compuestos, su estructura y otras características, se puede entender su interacción con otras moléculas y su posible actividad biológica, permitiendo respaldar las propiedades que popularmente se les atribuyen a las plantas. Existen diversos métodos para identificar a los grupos químicos presentes en las plantas a partir de extractos; enseguida se muestra la metodología que se llevó a cabo en el presente trabajo para el reconocimiento fitoquímico de los extractos más activos (hexánico y metanólico) en las pruebas antihelmínticas, utilizando reactivos de coloración para el reconocimiento de grupos químicos, así como el uso de espectroscopia de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  (RMN  $^1\text{H}$ ).

### 6.5.1 Pruebas de reconocimiento de grupos fitoquímicos

**Prueba de alcaloides:** A un tubo de ensaye se agregaron 200 mg de extracto, al cual se le adicionaron 5 ml de HCl (10%) y se calentó por 5 minutos a 40 °C. Posteriormente se enfrió y se filtró; el filtrado se dividió en tres tubos de ensaye y se le agregaron unas gotas de los reactivos de reconocimiento: Dragendorff, Mayer y Wagner. Una leve turbidez o precipitado (rojo a naranja, blanco a crema y marrón) evidencia la posible presencia de alcaloides.

**Prueba de cardiotónicos:** En un tubo de ensaye se agregaron 100 mg de extracto y 10 ml de etanol (96%), posteriormente se le adicionaron 5 ml de solución de acetato de plomo al 10% y 4 mL de agua destilada. La mezcla se calentó a baño maría durante 10 minutos y se filtró. El filtrado se agitó con 10 mL de cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) para posteriormente separar la capa clorofórmica en tres tubos de ensaye que se llevaron a sequedad. En el primer tubo de ensaye se realizó la reacción de Keller-Kilian, donde se adicionaron 3 mL de ácido acético glacial y cloruro férrico al 5% en metanol y unas gotas de ácido sulfúrico concentrado por las paredes del tubo. Se considera una prueba positiva a coloraciones intensas. En el segundo tubo de ensaye, se realizó la prueba de Lieberman-Burchard y se adicionó ácido acético, 3 mL de anhídrido acético y ácido sulfúrico concentrado (50:1). La coloración verde, azul, azul-verdoso o rojo es indicativo de una prueba positiva. En el último tubo de ensaye se realizó la prueba de Salkowski, al adicionar

cuidadosamente por las paredes gotas de ácido sulfúrico concentrado. Se considera una prueba positiva si se observa una coloración amarillo-rojo sangre.

**Prueba de cumarinas volátiles:** Se colocó en un tubo de ensaye 200 mg de extracto y 2 mL de etanol (96%); posteriormente se tapó con un papel filtro impregnado en solución diluida de NaOH y se llevó a un baño de agua (100°C) por minutos. El papel filtro fue removido y se examinó bajo luz UV, siendo la fluorescencia amarilla indicativa de la presencia de cumarinas.

**Prueba de flavonoides:** En un tubo de ensaye se colocaron 200 mg de extracto, 2 mL de etanol (96%) y algunos fragmentos de magnesio (Mg). Posteriormente, se agregaron unas gotas de HCl diluido. La formación de una coloración amarillo intenso se considera positiva.

**Prueba de taninos:** En un tubo de ensaye se colocaron 50 mg de extracto disuelto con 10 ml de agua destilada. Posteriormente se filtró, a 3 mL de extracto acuoso se le adicionaron 2 gotas de solución de cloruro férrico al 10%. Una coloración azul indica la presencia de taninos hidrolizables y una coloración verde de taninos condensados. Para esto también se realizaron pruebas de confirmación, el resto del extracto acuoso se dividió en tres partes iguales y se adicionaron en cada uno: solución de gelatina, solución gelatina-sal y solución salina. La aparición de precipitado blanco en los tubos con solución de gelatina y gelatina-sal serán resultados positivos; si también hay formación de precipitado blanco en la solución salina, se considera negativo.

**Prueba de saponinas:** En un tubo de ensaye se adicionaron 50 mg de extracto y 5 ml de agua destilada hirviendo. Se dejó enfriar y se agitó vigorosamente durante algunos minutos. Posteriormente, la mezcla se dejó reposar entre 15 y 20 minutos. La formación de espuma con apariencia de panal de abeja, se considerará prueba positiva, así como la altura de esta.

**Prueba de triterpenos y/o esteroides:** En un tubo de ensaye se colocaron 100 mg de extracto y 10 ml de cloroformo, posteriormente se filtró y se dividió el filtrado en dos tubos de ensaye. En el primer tubo de ensaye se realizó la prueba de Lieberman-Burchard (10 ml de anhídrido acético y dos gotas de ácido sulfúrico concentrado) y en el segundo tubo de ensaye la prueba de Salkowski. Un color verde, azul o rojo o un color amarillo-rojo sangre es positivo.

**Prueba de derivados antracénicos libres:** Se colocaron en un tubo de ensaye 100 mg de extracto y 5 ml de cloroformo, se agitaron y se dejaron reposar durante 15 minutos. Posteriormente, se

tomó la fase clorofórmica y se le agrego 1 ml de solución NaOH al 5%. La formación de una coloración rojiza en la fase acuosa indica la presencia de antraquinonas (reacción de Borntraeger).

### 6.5.2 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de $^1\text{H}$

A fin de identificar los metabolitos presentes en los extractos hexánico de raíz y metanólico de hoja se realizó un análisis mediante resonancia magnética nuclear RMN  $^1\text{H}$  en el Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

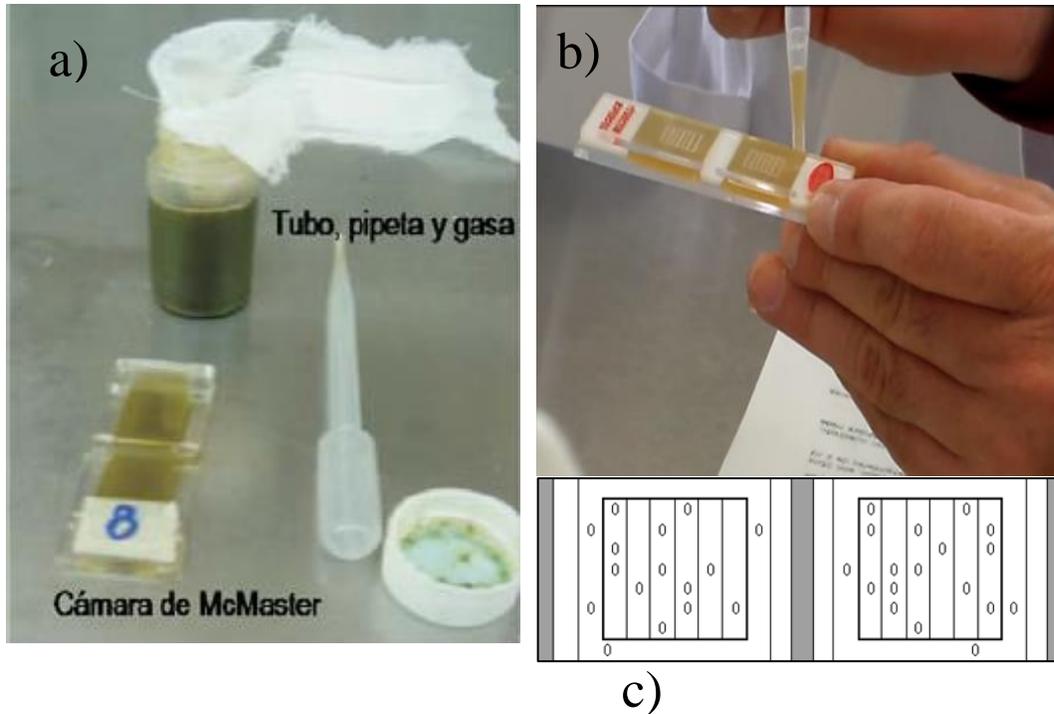
## 6.6 Obtención de germoplasma de *H. contortus*

### 6.6.1 Cuantificación de germoplasma y coprocultivo

Se utilizó un ovino joven, donador de germoplasma, infectado 21 días antes con 350 L<sub>3</sub> de *H. contortus* por vía oral. Para confirmar la infección, y previo a la realización del coprocultivo, muestras de heces frescas, tomadas directamente del recto, fueron procesadas para su cuantificación por la técnica de McMaster (López-Arellano *et al.*, 2010). El proceso permite estimar la cantidad de huevos por gramo de heces (HPG), brevemente: se colectaron 2 g de heces el cual es triturado y colocado en frascos con 28 mL de solución saturada de NaCl. La solución salina permite crear un gradiente de densidad, donde los huevos presentes en las heces se distribuyen en la parte superior del contenedor. Posteriormente, esta solución se vierte en frascos de 30 mL donde se les coloca un trozo de gaza o manta que filtra el material (figura 5a). Con una pipeta o gotero se toma una muestra de la superficie del frasco y se coloca en una cámara de McMaster para realizar el conteo HPG a 4x en microscopio (figura 5b), para estimar la suma total de HPG en las cámaras por gramo de heces mediante la siguiente formula:

$$HPG = \frac{Th * 100}{2}$$

Dónde: **Th**= Total de huevos en la cámara McMaster



**Figura 5.** Técnica de McMaster: **a)** Materiales para la prueba. **b)** Llenado de los compartimentos de la cámara de McMaster. **c)** Esquema del conteo de huevos. Tomado de la web: La guía RVC/ FAO para el diagnóstico parasitológico veterinario.

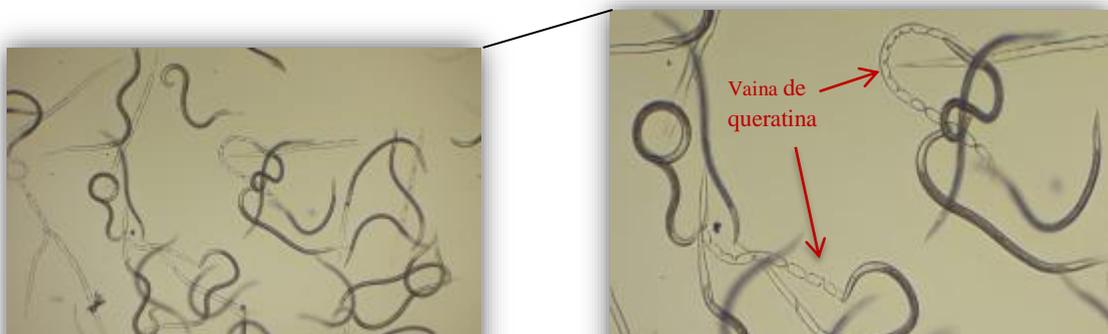
Coprocultivo. El coprocultivo tiene la finalidad de permitir el desarrollo de los huevos de NGI contenidos en las heces a L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> y L<sub>3</sub>. Este proceso proporciona las condiciones adecuadas (ej. humedad, temperatura y oxigenación) para ello se colectaron muestras de heces de un borrego donador en una palangana de plástico por 24 horas. Las muestras de heces se trituraron con ayuda de agua y se mezclaron con sustrato compuesto de hule espuma para facilitar la aireación y oxigenación de los huevos. El cultivo se mantiene a temperatura ambiente (25 a 35 C) cubierto con aluminio y gaza para permitir la aireación; así mismo, los cultivos se homogenizan para lograr una mejor oxigenación cada tercer día y se verificaba la humedad (Liéban *et al.*, 2011).



Transcurridos 7 días de incubación, se recuperan las L<sub>3</sub> por la técnica de migración larvaria (Baermann) donde se utiliza un embudo unido a un tubo de ensayo por 12 horas (figura 6). Posteriormente, el sedimento con L<sub>3</sub> se filtraron con papel de microscopio, para una limpieza parcial de L<sub>3</sub> sin detritus de heces. La eliminación de contaminantes y residuos de heces de L<sub>3</sub> se realizó con gradientes de densidad con sacarosa al 40% y centrifugación a 3500 rpm por 5 min, para la obtención de L<sub>3</sub>. Las larvas libres de contaminantes forman un anillo blanco en la parte superior del tubo y los residuos sedimentan. El anillo de L<sub>3</sub> fue transferido a tubos de 15 mL para la completa eliminación de sacarosa mediante tres lavados más con agua destilada utilizando centrifugación a 3500 rpm por 3 min (Liébano *et al.*, 2011).

### 6.6.2 Preparación del germoplasma de *H. contortus*

Para realizar los siguientes ensayos, se requirieron L<sub>3</sub> sin vaina protectora, tratando a los nematodos con hipoclorito de sodio al 0.187%. (Cloralex, producto comercial), y se monitoreó el proceso tomando una muestra de 5 uL para su observación en microscopio por un periodo de 3 a 5 minutos, tiempo aproximado que tarda el proceso (figura 7). Una vez completado el proceso las larvas se sometieron a tres lavados con agua destilada mediante centrifugación a 3500 rpm durante 3 minutos para su uso inmediato, en pruebas *in vitro* y para inóculos de jerbos.

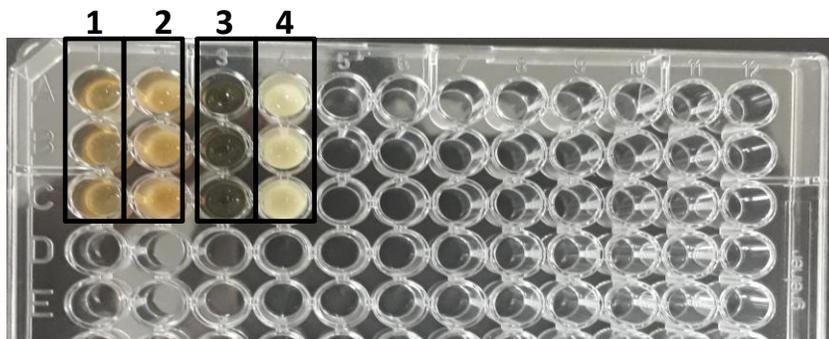


**Figura 7.** Proceso de desenvaine de L<sub>3</sub> de *H. contortus* utilizando hipoclorito de sodio al 0.187%.

## 6.7 Estimación de la DL<sub>50</sub> en *H. contortus*

### 6.7.1 Efecto letal e inhibición de la motilidad con extractos de raíces pilosas y planta silvestre

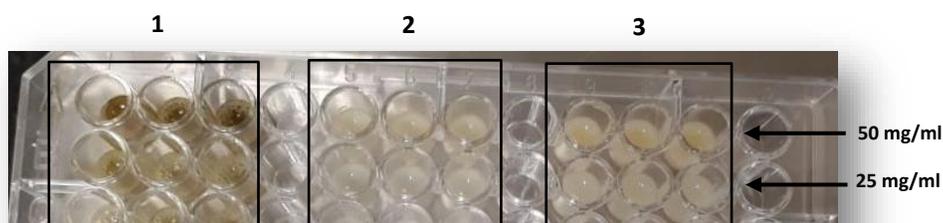
Previo a la DL<sub>50</sub>, se realizaron bioensayos para evaluar el efecto letal frente a L<sub>3</sub> sin vaina de *H. contortus* reflejándose en mortalidad e inhibición de la motilidad. Se probaron los extractos metanólicos, diclorometánicos y hexánicos provenientes del cultivo *in vitro*: RPWa1 y RPWa2 y de la raíz y las hojas de la planta colectada en campo más el extracto acuoso de raíz colectada también en campo. Los extractos se evaluaron a una sola concentración de 50 mg/mL, y se distribuyeron en placas de 96 pozos dónde se colocaron 50 µL de medio con 100 L<sub>3</sub> y 50 µl del tratamiento a evaluar, para un volumen final de 100 µl por pozo. Las placas fueron colocadas a temperatura ambiente con paños húmedos para mantener la humedad y evitar la desecación., los bioensayos se realizaron tres veces por triplicado (figura 8). Como control negativo se utilizó agua destilada y Tween 20 al 2%, siendo este último nuestro sistema de disolución para los extractos, y como control positivo se utilizaron sales puras de ivermectina (SIGMA, St. Louis Missouri, USA) a concentración de 1 mg/ml. Las lecturas se tomaron a las 48 y 72 horas con base en la mortalidad y la inhibición de motilidad de L<sub>3</sub> (Reyes *et al.*, 2016). Los tratamientos empleados en los bioensayos para determinar la mortalidad de L<sub>3</sub>, fueron también utilizados para determinar la inhibición de la motilidad, registrándose paralelamente ambos criterios.



**Figura 8.** Distribución de los extractos (50 mg/ml) y de los controles positivos y negativos (por triplicado) para determinar la mortalidad y la inhibición de la motilidad en *H. contortus*. **1:** hexánico RPWa1., **2:** hexánico RPWa2., **3:** hexánico hoja silvestre., **4:** hexánico raíz silvestre., **A:** agua destilada., **I:** ivermectina (1 mg/ml), **T:** tween20 (2%).

### 6.7.2 Estimación de la DL<sub>50</sub> de los extractos de *W. americana* frente a *H. contortus*

Se llevó a cabo una metodología similar a la utilizada para estimar el efecto letal de los extractos de diferente polaridad de *W. americana*, sin embargo, para determinar la DL<sub>50</sub> se seleccionaron los extractos con mayor efecto letal: metanólico de hoja, hexánico y diclorometánico de raíz. Los extractos fueron evaluados a diferentes concentraciones (50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56 y 0.78 mg/mL). En una placa de fondo plano de 96 pozos se distribuyeron los tratamientos colocando en cada uno de ellos aproximadamente 100 L<sub>3</sub> de *H. contortus* más 50 µL del tratamiento a la concentración correspondiente. También se utilizó como control negativo agua destilada y Tween 20 al 2%, y como control positivo ivermectina (SIGMA, agente antihelmíntico) a una concentración de 1 mg/mL (figura 9). Las placas fueron colocadas a temperatura ambiente como se mencionó anteriormente, los bioensayos se realizaron tres veces por triplicado y las observaciones se realizaron a las 48 y 72 horas.



**Figura 9.** Bioensayo para determinar la  $DL_{50}$ . Distribución de los extractos a diferentes concentraciones y de los controles positivos y negativos (todo por triplicado) en placa de 96 pozos. **1:** extracto metanólico de hoja., **2:** extracto diclorometánico de raíz., **3:** extracto hexánico de raíz., **A:** agua destilada., **I:** ivermectina (1 mg/ml)., **T:** tween20 al 2%.

### **6.8 Análisis estadístico para determinar el efecto letal y la $DL_{50}$ en *H. contortus***

Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial, donde los factores fueron: extracto (metanólico, diclorometánico y hexánico), tejido vegetal (RPWa1, RPSa2), hoja y raíz) y tiempo de evaluación (48 y 72 horas). Además, se utilizó la comparación múltiple de medias con el procedimiento Tukey a un nivel de confianza del 95 %. Finalmente, para la determinación de la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) se utilizó la metodología Probit. Para los análisis antes mencionados se utilizó el paquete estadístico SAS 9.0 (SAS, 2006).

## **6.9 Bioensayos *in vivo* para evaluar el efecto nematocida de extractos de diferente polaridad contra *H. contortus* en jerbos (*Meriones unguiculatus*)**

Se utilizó la metodología descrita por Zamilpa et al., (2018), con algunas modificaciones: se evaluó una población de 20 jerbos machos y hembras de 21 a 28 días de edad, proporcionados por el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). Los jerbos se desparasitaron con 50 µl de un producto que contiene (Closantel 25 mg/mL y fenbendazol 25 mg/mL) administrado por vía oral/día, durante 2 días. Zamilpa et al., (2018), determinaron que la dosis oral óptima de L<sub>3</sub> para infectar a los jerbos es de 20,000 L<sub>3</sub> (germoplasma del nematodo *H. contortus* colectado en el CENID-SAI, INIFAP), para establecer una buena infección. De manera similar, se determinó los días 12 y 13 como el tiempo óptimo después de la infección para sacrificar a los jerbos y evaluar la posible reducción de la carga parasitaria, sin embargo, en este trabajo se redujo el tiempo a 9 días y la dosis oral a 10,000 L<sub>3</sub>.

Posteriormente, todos los animales fueron tratados con dexametasona solución (4mg/mL) (Azium, Schering Plough Lab) por vía intramuscular a dosis total de 100 µL por día durante 3 días consecutivos antes de la infección artificial para mejorar el establecimiento de L<sub>3</sub>. Cada animal se infectó por vía oral con 100 µL de una suspensión acuosa conteniendo 10,000 L<sub>3</sub>. Cuatro grupos de 5 jerbos se asignaron aleatoriamente: los grupos 1, 2 y 3 se trataron por vía oral con el extracto metanólico de hojas, diclorometánico y hexánico de raíz respectivamente, administrando en cada caso 100 µl del extracto a una concentración de 50 mg/ml cada tercer día durante 3 días. El grupo 4 fue tratado solo con agua (100 µL) como control negativo, para indicar la viabilidad de las larvas.

Todos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical a los 9 días después de la infección, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO 1999 sobre especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Los animales fueron sometidos a una necropsia y los parásitos totales se recuperaron de sus estómagos. Los parásitos recuperados finalmente se contaron, y los números medios por grupo se estimaron para la comparación. De manera similar, la mucosa gástrica de cada animal se colocó en un jugo gástrico artificial para simular la digestión estomacal y obtener larvas en la mucosa.

Se consideró como criterio de evaluación: el promedio de nematodos recuperados en los tratamientos en comparación con el promedio de nematodos recuperados del grupo 3 (control: agua). El número promedio de nematodos recuperados en el grupo control se observaron 100% viables.

El porcentaje de reducción se estimó con base a la siguiente fórmula (Mendoza-de Gives *et al.*, 1998):

$$\textit{Porcentaje de reducción de parásitos} = \frac{\bar{X}\text{Control} - \bar{X}\text{tratamiento}}{\bar{X}\text{Control}} * 100$$

Donde:

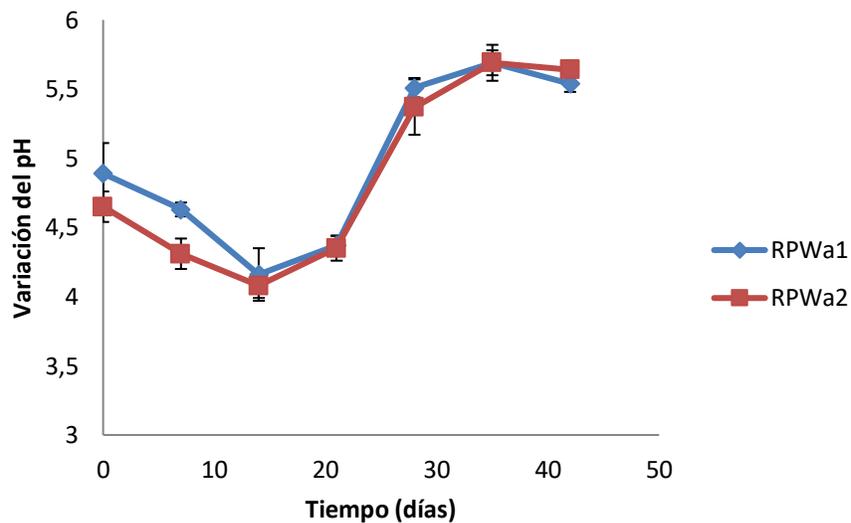
$\bar{X}\text{Control}$  = media del número de nemátodos recuperados del grupo del control negativo.

$\bar{X}\text{tratamiento}$  = media del número de nemátodos recuperados de los tratamientos.

## 7. RESULTADOS

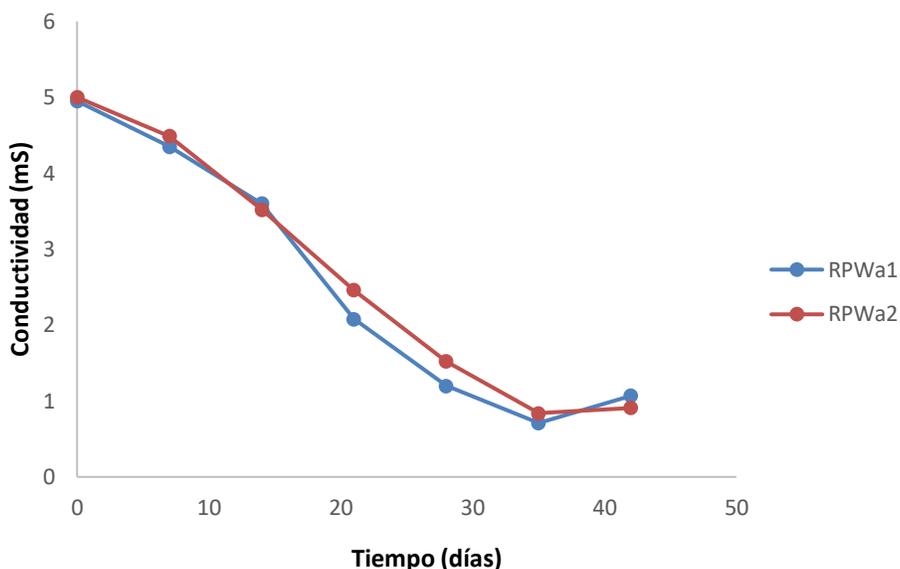
### 7.1 Determinación de la curva de crecimiento de cultivos de las raíces pilosas de *W. americana*

Durante las seis semanas de cinética, se observó un comportamiento similar en la producción de biomasa, pH y conductividad entre RPWa1 y RPWa2. En cuanto al pH, desde el inicio de la cinética se presentó una disminución del pH inicial hasta los 14 días de cultivo, a partir de este se observó un incremento a valores más alcalinos incluso por encima del valor inicial observado en el medio de cultivo (figura 10). Esto se puede explicar debido al consumo de nutrientes adicionados al medio de cultivo como el nitrato y el amonio que pueden afectar el pH, ya que el consumo de nitrato implica una acidificación, contrario a lo que ocurre cuando se consume el amonio (Arias *et al.*, 2009).



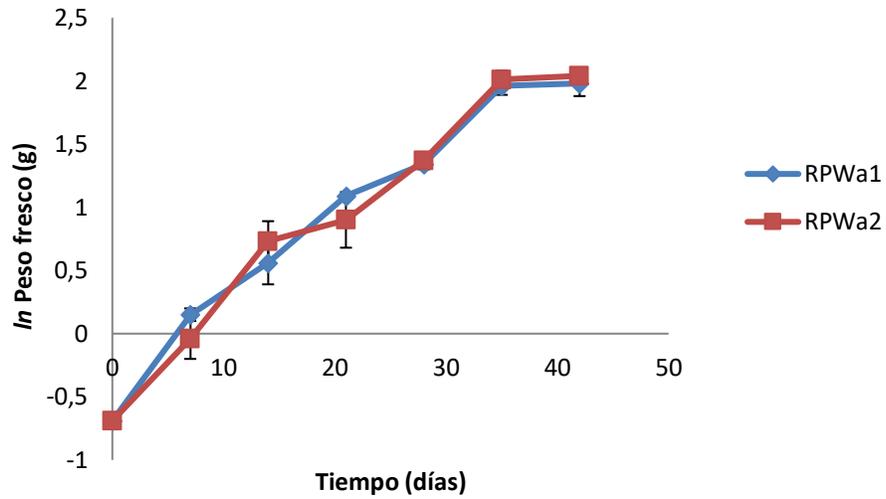
**Figura 10.** Variación de pH en RPWa1 y RPWa2 durante la cinética de crecimiento tipo lote de 42 días. Los datos representan la media  $\pm$  S.D. n=3.

Desde el inicio del ensayo se observó una disminución de la conductividad ( $mS$ ) proporcional a la fase de crecimiento en ambas líneas de raíces pilosas, lo que indica un consumo progresivo de nutrientes tales como las sales disueltas en el medio de cultivo (figura 11).

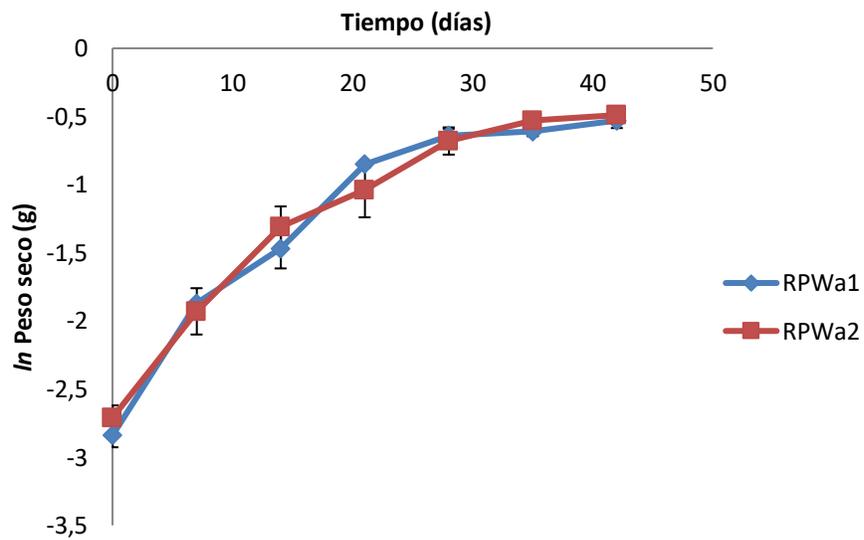


**Figura 11.** Variación de la conductividad (*mS*) en el medio de cultivo a lo largo de la cinética de crecimiento. Los datos representan la media  $\pm$  S.D.  $n=3$ .

La densidad máxima de los cultivos se presentó a los 42 días en ambas líneas. Para RPWa1 fue de  $0.588 \pm 0.03$  g en peso seco y para RPWa2 fue de  $0.613 \pm 0.02$  g en peso seco, lo que significa un incremento en 10 veces de la biomasa en el inoculo inicial (0.06 g). El crecimiento medido en función del peso fresco y seco no mostró gran diferencia entre ambas líneas (figura 12). Aparentemente no se observa una fase de adaptación, ya que se observa un incremento de la biomasa de manera progresiva una vez inicia la cinética de crecimiento, esto se puede deber a la gran adaptación de ambos cultivos de RP al medio líquido. Debido al crecimiento constante tampoco fue posible observar una fase exponencial, así como una fase estacionaria y mucho menos una fase de muerte (figura 13). Es probable que un inóculo mayor al utilizado en la presente cinética, así como una reducción del tiempo de evaluación, nos permita estimar de manera adecuada el comportamiento de ambos cultivos de raíces pilosas además de poder calcular los parámetros cinéticos como lo son la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación. Los valores de los parámetros cinéticos de crecimiento dependerán en muchas ocasiones del sistema de cultivo, la especie vegetal y otros factores, y nos permiten reconocer cuales cultivos son aptos para un proceso de escalamiento biotecnológico, ya que un efecto positivo sobre estos permitirá disminuir los tiempos y aumentar los rendimientos y las producciones de algún proceso metabólico o bioquímico en nuestro sistema (Zapata *et al.*, 2005).



**Figura 12.** Variación del peso fresco (g) entre RPWa1 y RPWa2. Los datos representan el  $\ln$  de la media  $\pm$  S.D.  $n=3$ .



**Figura 13.** Variación de peso seco (g) entre RPWa1 y RPWa2. Los datos representan el  $\ln$  de la media  $\pm$  S.D.  $n=3$ .

## 7.2 Obtención de los extractos a partir de las hojas, raíces y líneas transformadas RPWa1 y RPWa2

Posterior a la maceración de la biomasa seca proveniente de las hojas y raíces de la planta colectada en campo y de las dos líneas de raíces pilosas con los solventes orgánicos de diferente polaridad (hexano, diclorometano y metanol) se obtuvo el rendimiento de cada uno de los extractos mediante la fórmula anteriormente mencionada en la metodología (apartado 6.4).

Se observó el mayor rendimiento en el extracto metanólico (20.9%) de la línea RPWa1, así como un 17.5% en la línea RPWa2 en este mismo extracto, seguido por el diclorometánico (7.16%) y el hexánico (5.83%) de RPWa2 (Cuadro 3). A pesar de la diferencia entre RPWa1 y RPWa2, ambas líneas presentan rendimientos superiores a lo observado en los extractos de hoja y raíz colectadas en campo, donde el rendimiento más alto fue de 10.65 y 9.1% respectivamente en el extracto metanólico (Cuadro 3). Mientras que otros reportes de rendimiento en *W. americana* de los extractos hexánico, diclorometánico y metanólico son relativamente más bajos, llegando a ser de 0.01%, 0.01-0.6% y de 1-15% respectivamente (Jansen *et al.*, 2010; Mundo, 2012; Cretton *et al.*, 2015).

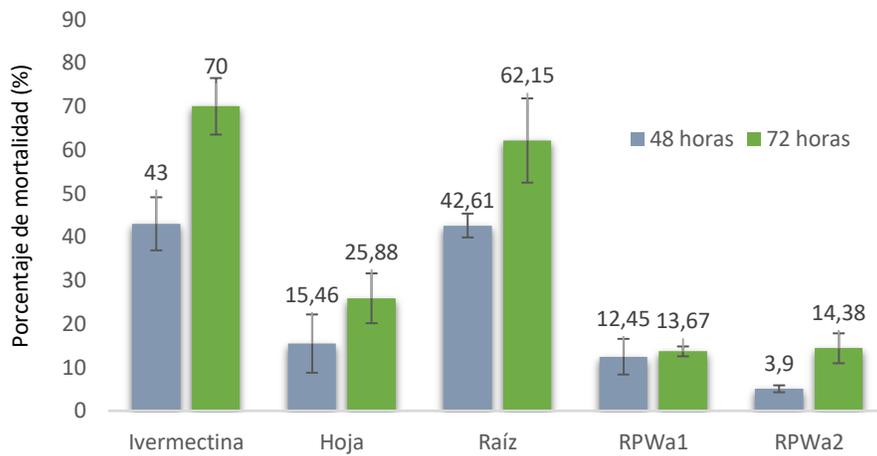
**Cuadro 3.** Rendimiento de extractos de plantas silvestres y raíces pilosas de *W. americana*.

Biomasa de Líneas (g)	Tipo de Extracto						
	Hexano		Diclorometano		Metanol		
	Extracto (g)	Rendimiento (%)	Extracto (g)	Rendimiento (%)	Extracto (g)	Rendimiento (%)	
<b>RPWa1</b>	14.0	0.42	3.0%	0.73	5.21%	2.93	<b>20.9%</b>
<b>RPWa2</b>	6.0	0.35	5.83%	0.43	7.16%	1.05	<b>17.5%</b>
<b>Hoja</b>	50.0	2.17	4.16%	1.16	2.32%	4.55	9.1%
<b>Raíz</b>	40.0	0.55	1.37%	1.09	2.72%	4.26	10.65%

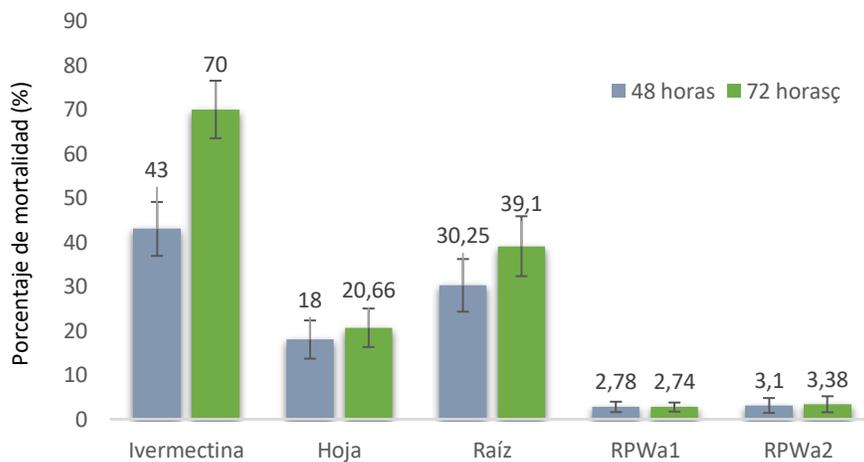
#### 7.4 Determinación del efecto letal en *H. contortus*

El efecto de los extractos sobre L<sub>3</sub> se consideró a partir de la inhibición de la motilidad y la mortalidad. El agua y el Tween-20 que funcionaron como controles negativos no afectaron la motilidad y mortalidad de las larvas, por lo que los resultados en los extractos brindaron certeza. A las 48 horas de evaluación, los mayores porcentajes de mortalidad se obtuvieron con los extractos hexánico de raíz y metanólico de hoja con 42.61 y 39.1% respectivamente (figura 14 y 16). Así mismo, el extracto diclorometánico de raíz mostró 30.25%, sin embargo, no se determinó diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en comparación con el extracto metanólico de hoja con 39.1% (Cuadro 4). En cuanto a las raíces pilosas el mayor efecto lo presentó la línea RPWa2 del extracto hexánico con 14.38% de mortalidad, sin embargo, este efecto no fue significativo en comparación con los extractos más activos ( $P < 0.05$ ). El extracto acuoso de raíz no presentó actividad en este periodo de evaluación.

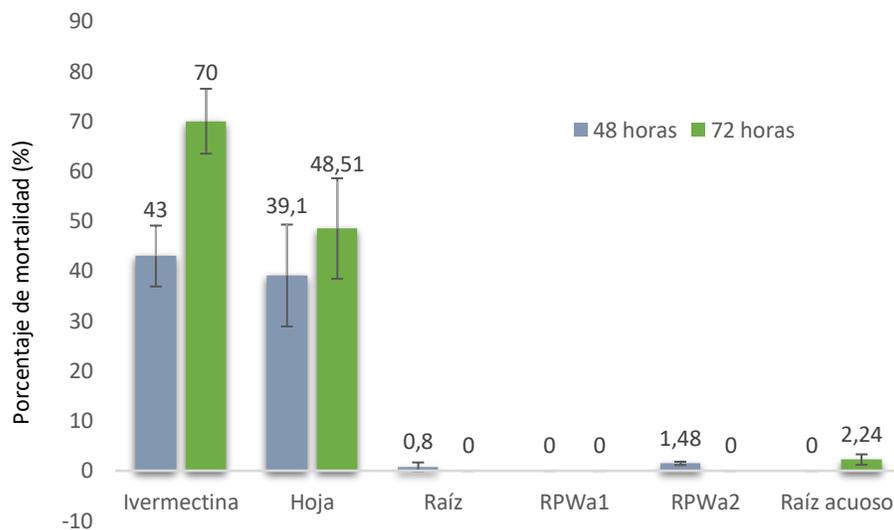
Cabe mencionar que se observó un aumento en la mortalidad en extractos obtenidos de hoja y raíz silvestre con respecto al tiempo. La mejor actividad se determinó a las 72 horas con el extracto hexánico de raíz, con mortalidad del 62.15% (figura 14), seguido del extracto metanólico de hoja con un 48.51% (figura 16) y diclorometánico de raíz (39.1%) (figura 15). Solo el extracto hexánico de la línea RPWa2 mostró aumento significativo ( $P < 0.05$ ), de la mortalidad de 3.9% a las 48 horas a 14.38% después de 72 horas de tratamiento (figura 14). Contrariamente, el extracto metanólico, diclorometánico de ambas líneas de raíces pilosas y además el acuoso de raíz silvestre no mostraron incremento en la actividad antihelmíntica de acuerdo al tiempo (figura 15 y 16). En términos generales el extracto más activo fue el hexánico, y la raíz silvestre fue el tejido que presentó mejor actividad antihelmíntica (Cuadro 4). Cabe mencionar que el extracto hexánico de raíz (el más activo), presenta una actividad similar que el agente antihelmíntico (ivermectina) reportado en otro trabajo donde el porcentaje de mortalidad es de 43% a las 48 horas y de 70% a las 72 horas frente a *H. contortus* (Reyes *et al.*, 2016).



**Figura 14.** Porcentaje de mortalidad del extracto hexánico a las 48 y 72 horas de evaluación contra larvas infectantes de *H. contortus*.



**Figura 15.** Porcentaje de mortalidad del extracto diclorometánico a las 48 y 72 horas de evaluación contra larvas infectantes de *H. contortus*.



**Figura 16.** Porcentaje de mortalidad del extracto metanólico y acuoso a las 48 y 72 horas de evaluación contra larvas infectantes de *H. contortus*.

De acuerdo con el análisis estadístico se observa diferencia significativa en la actividad ( $P < 0.0001$ ) presente en los diferentes extractos, siendo el extracto hexánico de raíz ( $62.15 \pm 9.68$ ) el tratamiento con mayor efecto letal en las pruebas *in vitro* frente a *H. contortus*. En forma similar, el extracto metanólico de hoja también presenta importante actividad biológica ( $48.51 \pm 10.1$ ). Así mismo, se observaron diferencias estadísticas entre el material de la planta colectada en campo y las líneas transformadas ( $P < 0.0001$ ). El análisis de Tukey ( $P < 0.05$ ), muestra similitudes entre la actividad de ambas líneas transformadas RPWa1 ( $13.67 \pm 1.14^s$ ) y RPWa2 ( $14.38 \pm 3.44^s$ ) y diferencias significativas con los extractos de raíz ( $61.15 \pm 9.68^a$ ) y hoja ( $48.51 \pm 10.07^b$ ), siendo la raíz la más activa.

**Cuadro 4.** Porcentaje de la mortalidad de L<sub>3</sub> de *H. contortus* bajo diferentes extractos provenientes del cultivo *in vitro* y planta silvestre de *W. americana*

Extracto	Tejido vegetal	Tiempo de evaluación	
		48 horas	72 horas
Hexánico	Hoja	15.46 ± 6.70 <sup>g</sup>	25.88 ± 5.73 <sup>ef</sup>
	Raíz	<b>42.61 ± 2.74<sup>cb</sup></b>	<b>62.15 ± 9.68<sup>a</sup></b>
	RPWa1	12.45 ± 4.10 <sup>gh</sup>	13.67 ± 1.14 <sup>g</sup>
	RPWa2	3.90 ± 0.80 <sup>ih</sup>	14.38 ± 3.44 <sup>g</sup>
Diclorometánico	Hoja	18.00 ± 4.32 <sup>gf</sup>	20.66 ± 4.35 <sup>gf</sup>
	Raíz	<b>30.25 ± 5.95<sup>ed</sup></b>	<b>39.10 ± 6.77<sup>cd</sup></b>
	RPWa1	2.78 ± 1.17 <sup>i</sup>	2.74 ± 1.02 <sup>i</sup>
	RPWa2	3.10 ± 1.68 <sup>ih</sup>	3.39 ± 1.81 <sup>ih</sup>
Metanólico	Hoja	<b>39.10 ± 10.20<sup>cd</sup></b>	<b>48.51 ± 10.07<sup>b</sup></b>
	Raíz	0.86 ± 0.87 <sup>i</sup>	0.00 <sup>i</sup>
	RPWa1	0.00 <sup>i</sup>	0.00 <sup>i</sup>
	RPWa2	1.48 ± 0.33 <sup>i</sup>	0.00 <sup>i</sup>
Acuoso	Raíz	0.00 <sup>i</sup>	2.24 ± 1.05 <sup>i</sup>
Agua		-	-
Tween 20		-	-
Ivermectina 2.5mg/ml	Reyes <i>et al.</i> , 2016	43 ± 0	70 ± 0
Extracto			< 0.0001
Explante planta			< 0.0001
Tiempo			< 0.0001
Coefficiente de variación			30.009
R <sup>2</sup>			0.946251

\* Los datos están representados como la media ± desviación estándar de tres replicas. Las medias con letras diferentes indican diferencia significativa (P<0.05) según la prueba de Tukey

### 7.5 Inhibición de la motilidad en L<sub>3</sub> de *H. contortus*

A las 72 horas de evaluación se determinó que los mejores extractos para inhibir la motilidad de L<sub>3</sub>, fueron el metanólico de hoja (39.65 ± 5.53) y el hexánico de raíz (31.25 ± 8.01) (Cuadro 5). En la mayoría de los extractos se observó que esta actividad es independiente del tiempo, estadísticamente no hay una relación del efecto de la inhibición de la motilidad con el mismo (P<0.0001). Además, los extractos de hojas, raíces y líneas transformadas presentan diferencias significativas, considerando a los extractos de hojas y las raíces las más activas en la inhibición de la motilidad. En cuanto a las raíces pilosas, la mayoría no supero el 7% de actividad, excepto la línea RPWa2 del extracto metanólico que llegó al 13% a las 48 horas de evaluación (Cuadro 5).

La actividad presente en ambas líneas de raíces pilosas no se vio influenciada con el tiempo, sino más bien, se mantuvo constante durante las 72 horas de evaluación. Cabe señalar que el efecto observado en el extracto metanólico de hoja (39.65%) es muy parecido al presente en la ivermectina, mostrando un aumento de la actividad con respecto al tiempo como se esperaba dado su mecanismo de acción, ya que actúa sobre canales de cloro de las células somáticas musculares produciendo una parálisis del nematodo, impidiendo así su alimentación y desarrollo (Köhler, 2001), que, aunque no causan la muerte del parásito en el periodo de evaluación establecido si se observa una inhibición de la motilidad considerable, debido a que no podría llegar a infectar al hospedero (50%) (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Porcentaje de inhibición de la motilidad de L<sub>3</sub> de *H. contortus* con diferentes extractos provenientes del cultivo *in vitro* y planta silvestre de *W. americana*.

Extracto	Tejido vegetal	Tiempo de evaluación	
		48 horas	72 horas
Hexánico	Hoja	3.61 ± 1.02 <sup>fgh</sup>	4.17 ± 0.81 <sup>fgh</sup>
	Raíz	<b>31.25 ± 8.01<sup>b</sup></b>	5.61 ± 1.98 <sup>efg</sup>
	RPWa1	5.24 ± 0.91 <sup>fg</sup>	6.65 ± 0.99 <sup>efg</sup>
	RPWa2	6.32 ± 1.39 <sup>efg</sup>	4.95 ± 1.27 <sup>fg</sup>
Diclorometánico	Hoja	2.15 ± 0.86 <sup>gh</sup>	3.37 ± 1.41 <sup>fgh</sup>
	Raíz	0.00 <sup>h</sup>	5.6 ± 0.67 <sup>efg</sup>
	RPWa1	6.74 ± 1.68 <sup>efg</sup>	3.11 ± 1.05 <sup>fgh</sup>
	RPWa2	3.31 ± 0.79 <sup>fgh</sup>	5.38 ± 1.33 <sup>fg</sup>
Metanólico	Hoja	<b>25.06 ± 7.34<sup>c</sup></b>	<b>39.65 ± 5.53<sup>a</sup></b>
	Raíz	5.54 ± 2.39 <sup>efg</sup>	6.88 ± 1.21 <sup>efg</sup>
	RPWa1	5.1 ± 1.17 <sup>fg</sup>	6.38 ± 1.18 <sup>efg</sup>
	RPWa2	13.58 ± 0.81 <sup>d</sup>	3.37 ± 1.28 <sup>fgh</sup>
Acuoso	Raíz	10.3 ± 0.86 <sup>cd</sup>	7.62 ± 1.51 <sup>ef</sup>
Agua		-	-
Tween 20		-	-
Ivermectina (1 mg/mL)		43.5 ± 8,30	49,9 ± 10.50
Extracto			< 0.0001
Explante planta			< 0.0001
Tiempo			< 0.0001
Coefficiente de variación			29.60427
R <sup>2</sup>			0.938203

\* Los datos están representados como la media ± desviación estándar de los porcentajes de mortalidad. Las medias con letras diferentes indican diferencia significativa (P<0.05) según la prueba de Tukey.

## 7.6 Determinación de la DL<sub>50</sub> de los extractos activos de *W. americana* frente a *H. contortus*

Se realizaron los bioensayos para estimar la DL<sub>50</sub> de los extractos metanólico de hoja, hexánico y diclorometánico de raíz, sin embargo, la respuesta de los extractos evaluados no superó el 50% de la actividad antihelmíntica suficiente para realizar de manera adecuada el análisis Probit. Por lo que no fue posible obtener la DL<sub>50</sub> como se planteó en el presente proyecto. Se cree que la actividad de los extractos se vio afectada por un cambio en las propiedades fisicoquímicas de los mismos, ya que estos se evaluaron en un tiempo (semanas) posterior a diferencia de la evaluación del efecto letal donde los extractos estaban recién recuperados.

## 7.7 Efecto nematicida del extracto hexánico de raíz, metanólico de hoja y diclorometánico de raíz contra *H. contortus* en jerbos (*Meriones unguiculatus*)

La actividad nematicida *in vivo* se evaluó en jerbos, una vez que estos son infectados de manera artificial con larvas L<sub>3</sub> estas pasan por un proceso de muda generando larvas L<sub>4</sub> que les permite alimentarse de sangre del hospedero. La confrontación de los extractos contra L<sub>4</sub> mostraron actividad nematicida importante, en comparación con el tratamiento control. Se observó reducción de la carga parasitaria de 59.4%, 46.6% y un 28.1% con los extractos: hexánico de raíz, metanólico de hoja y el diclorometánico de raíz, respectivamente (Cuadro 6). Comparando estos resultados con los obtenidos *in vitro*, el efecto letal se mantiene para estos extractos y aunque es un porcentaje ligeramente menor es un efecto positivo.

La actividad de los extractos más activos del presente estudio es similar a lo observado por Zamilpa *et al.*, (2018), donde utilizaron el mismo modelo para la evaluación nematicida frente a *H. contortus* con extracto hexánico de partes aéreas de *Chenopodium ambrosioides* y de *Castela tortuosa*, además de una combinación (1:1) de ambos extractos, demostrando una reducción larvaria del 45.86%, 27.15% y un 57.36% respectivamente. Tomando en cuenta que en dicho trabajo se compara la actividad de los extractos crudos con la actividad del Febendazol (97%, fármaco antihelmíntico), el efecto de los extractos evaluados en nuestro trabajo fue alrededor de 60% y 50% considerado alto si se compara con el compuesto puro. Aunque, la eficacia de los extractos *in vivo* se puede considerar como buena, se pueden realizar cambios en las condiciones de evaluación a las que sometemos los extractos que pueden reflejarse en una eficacia mejorada como: un aumento de la dosis utilizada, usando otras vías de administración del tratamiento, evaluando diferentes vehículos para aumentar la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos o también probando otro tipo de solventes orgánicos para la obtención de extractos y la posterior purificación de los compuestos activos (Zamilpa *et al.*, 2018).

**Cuadro 6.** Reducción de la carga parasitaria en jerbos utilizando extractos de la planta silvestre.

Grupo experimental	# de individuos	Tratamiento	$\bar{x}$ de nematodos recuperados	% de reducción larvaria
1	5	Hexánico de raíz	35	59.42
2	5	Diclorometánico de raíz	62	28.1
3	5	Metanólico de hoja	46	46.66
4	5	Control (agua)	86.25	Control

### 7.3 Análisis fitoquímico de los extractos hexánico de raíz y metanólico de hoja mediante reactivos de coloración/precipitación y RMN $^1\text{H}$

Mediante el análisis fitoquímico utilizando reactivos de colorimetría para el reconocimiento químico, se pudieron identificar compuestos del tipo alcaloide, cumarinas volátiles, triterpenos/esteroides, flavonoides, saponinas y taninos. Cabe mencionar que para el extracto hexánico de raíz hubo varias pruebas que no fueron posibles realizarlas debido a la poca disposición de extracto para dichas pruebas (Cuadro 7). Complementariamente se realizó el análisis químico mediante RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) donde se pudo corroborar la presencia de algunos compuestos identificados mediante las reacciones colorimétricas como flavonas y triterpenos, además de sacáridos y ácidos grasos en el extracto metanólico de hoja, así como la presencia de glucósidos, flavonas, terpenos y ácidos grasos en el extracto hexánico de raíz.

**Cuadro 7.** Compuestos fitoquímicos identificados en los extractos activos de *W. americana*.

Compuesto	Extracto	
	Metanólico de hoja	Hexánico de raíz
Alcaloides	+++	++
Cardiotónicos	-	NE
Cumarinas v.	++	-
Flavonoides	+/-	NE

<b>Saponinas</b>	++	+
<b>Triterpenos y/o esteroides</b>	+++	++
<b>Taninos</b>	+/-	-
<b>Derivados de antracénicos libres</b>	-	NE

---

(-) Reacción negativa. (+/-) Reacción dudosa. (+) Reacción positiva débil.  
 (++) Reacción positiva media. (+++) Reacción positiva fuerte. **NE**: no evaluado.

## 8. DISCUSIÓN

Las nematodosis en salud pública y salud animal presentan problemas de prevalencias altas y principalmente resistencia a diversos antihelmínticos poniendo en riesgo la producción animal y la seguridad alimentaria (Javitt *et al.*, 2013). La generación de metabolitos derivados de plantas es una opción de tratamiento a futuro, como un método integral de control. El presente estudio demostró el efecto letal y nematicida de dos extractos derivados de la planta *Waltheria americana* sobre el estadio L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub> del nematodo hematófago de rumiantes *H. contortus*. Cabe mencionar que los resultados presentados, se evaluaron durante dos periodos de 48 y 72 horas, tomando en cuenta la actividad de la ivermectina sobre este nematodo. La mejor actividad se presentó en el extracto hexánico de raíz, seguido del metanólico de hoja, ambas fracciones se pueden considerar de actividad alta (50-60%), en comparación con bioensayos con el nematodo *M. incognita* donde se observaron efectos de mortalidad de baja a moderada (23- 46%) del extracto acuoso de dos especies de la familia Meliaceae, dicho efecto se les atribuye a los terpenoides presentes en los extractos (Maregiani *et al.*, 2010).

La actividad de los extractos está relacionada con los componentes del mismo, se ha observado mortalidad con mayores índices que los presentados en este trabajo, por ejemplo, el efecto del extracto acuoso crudo y fraccionado de *Morus alba* mostró mortalidad del 80% al cabo de una hora posterior a la confrontación del extracto con L<sub>3</sub> de *Trichostrongylus* y *Haemonchus*, mientras que a las 2 horas de exposición esta mortalidad aumentó a 96%, esta actividad importante se atribuyó a la mezcla de compuestos polifenólicos mayoritarios como los flavonoides (quercetina y rutina), cumarinas y fenoles simples (resveratrol) (García *et al.*, 2005). La actividad del extracto metanólico de hoja de *W. americana* podría estar relacionada a la presencia de waltherionas, anteriormente se ha informado sobre la actividad antihelmíntica de este grupo de compuestos (waltheriona A, waltheriona C, waltheriona E y 1-5`metoxiwaltheriona A) obtenido a partir de este mismo tipo de extracto frente a nematodos del nudo de raíz (*Meloidogyne* spp.) en bioensayos *in vitro* e *in vivo* (Jang *et al.*, 2015; 2019). El contenido de waltherionas de la parte aérea y raíces principalmente ya se ha reportado anteriormente en *W. americana*, por ejemplo, se han identificado las waltherionas E, F, G, H, I, J, K y L en raíces y han sido evaluadas contra el protozooario *Trypanosoma cruzi* (zoonosis parasitaria) con resultados positivos (Cretton *et al.*, 2014). También se demostró la actividad antimicrobiana de las waltherionas M, N, O, P y Q provenientes de las partes aéreas (Cretton *et al.*, 2016). Estos estudios sobre las waltherionas sugieren una fuerte actividad antiparasitaria y antimicrobiana, y es posible que estos compuestos estén presentes en el extracto metanólico de hoja, pero son necesarios estudios fitoquímicos más profundos para determinar cuáles son las moléculas responsables de dicha actividad.

En cuanto a las raíces pilosas el efecto fue significativamente menor, el extracto hexánico de la línea RPWa2 fue el más activo, seguido del mismo extracto de la RPWa1, ambos a las 72 horas. Este efecto de las raíces pilosas podría verse incrementado utilizando una mezcla de ambos para incrementar el efecto letal, Zamilpa *et al.*, (2018), observaron mayor efecto de mortalidad sobre L<sub>3</sub>

de *H. contortus* cuando combinaron los extractos hexánicos de *Chenopodium ambrosioides* y *Castella tortuosa*, obteniendo un efecto combinado del 98.7% a nivel *in vitro* y el 57.36% a nivel *in vivo*. Demostrando que puede existir una actividad mejorada por la interacción y posible sinergismo de las moléculas de los diferentes extractos. La mortalidad presentada por los extractos en este proyecto es prometedor, ya que se observó diferencia significativa con respecto al tiempo ( $P < 0.0001$ ), por lo que suponemos que este efecto letal se puede ver potenciado en un periodo de evaluación más largo, como sucede con los antihelmínticos comerciales de larga duración, como el caso de la ivermectina, donde el efecto clínico antihelmíntico aumenta y persiste aproximadamente dos semanas después de la aplicación del tratamiento (Olmedo *et al.*, 2015). Sin embargo, son necesarios más estudios sobre los cultivos *in vitro* de raíces pilosas evaluando otro tipo de solventes para la obtención de los extractos, así como otras metodologías (ej. elicitación) que puedan permitir una mayor producción de los metabolitos secundarios responsables de la actividad antihelmíntica. Además, realizar estudios relacionados al perfil metabólico que mantiene el material colectado en campo y las raíces pilosas para poder relacionar la producción de ciertos compuestos con actividad antihelmíntica presentes en las raíces y hojas de la planta silvestre y que posiblemente estén ausentes en las RP o bien se encuentren en pequeñas cantidades.

En cuanto a la inhibición de la motilidad, se observó que el extracto metanólico de hoja y el hexánico de raíz fueron los más activos, este efecto puede atribuirse a la constitución química de cada uno de estos, en *W. americana* se han identificado una gran cantidad de metabolitos secundarios en extractos polares (metanol, diclorometano) como saponinas, alcaloides, antraquinonas, flavonoides, taninos, fenoles y glucósidos cardiacos (Cretton *et al.*, 2014; Hernández *et al.*, 2009), al parecer la inhibición de la motilidad está relacionada con la mortalidad en este estadio larvario. Existen otros reportes donde la actividad de extractos diclorometánicos y acuosos de *Cucúrbita moschata* fue superior a la presente en nuestros extractos, mostrando un efecto de 86.1% y 92.1% respectivamente frente a *H. contortus*, se sabe que *C. moschata* es rica en terpenoides a lo que se le atribuye la inhibición de la motilidad (Marie *et al.*, 2009). Es posible que la actividad nematocida mostrada por los extractos evaluados en el presente proyecto sea una consecuencia de varios factores, como, por ejemplo, la presencia de compuestos tóxicos solubles en agua, metabolitos microbianos, alta resistencia osmótica, alteraciones del pH o simplemente eliminación de oxígeno de las soluciones (Insunza *et al.*, 2001). Mientras que la actividad del extracto hexánico se puede relacionar con lo observado en otros trabajos, donde los compuestos apolares presentan una importante actividad antihelmíntica, por ejemplo, se evaluaron los aceites esenciales de 27 especies vegetales sobre *M. javanica*, y se observó una inhibición de la motilidad del 80%, este efecto se atribuye a moléculas como el carvacrol, t-anetol, timol y la carvona (Oka *et al.*, 2000). Moléculas similares podrían ser las responsables de la actividad positiva del extracto hexánico de raíz, se ha reportado que una característica de los aceites esenciales es su hidrofobicidad, estos impregnan la membrana celular y matan a los parásitos al afectar las vías metabólicas citoplasmáticas o de gránulos (Munguía *et al.*, 2013).

La inhibición de la motilidad no depende del tiempo ( $P < 0.0001$ ), por lo que esto puede traducirse en un efecto de los extractos inmediatamente al contacto con las larvas, que, aunque no las mata, las paraliza y esto podría mantenerse hasta provocar la muerte por inanición en un periodo de tiempo mayor, parecido a lo que sucede con las LM y los IMZ, antihelmínticos de amplio espectro

de acción (Köhler, 2001). Estos resultados obtenidos a partir de los extractos evaluados, también sugiere pérdida de la capacidad para infectar al hospedero.

Por otro lado, los resultados que mostraron los extracto hexánico de raíz y metanólico de hoja en las pruebas *in vitro* (62.15% y 48.51%), respectivamente, concuerdan con lo observado en las pruebas *in vivo* (59.4 y 46.6) de los mismos extractos respectivamente, y esto es positivo, se ha mencionado por otros autores la importancia de que los resultados de los test *in vitro* sean siempre validados *in vivo* antes de hacer generalizaciones respecto a las propiedades antiparasitarias de los metabolitos secundarios (Athanasiadou y Kyriazakis., 2004). Esto es importante y se debe considerar ya que la eficacia de los extractos crudos en condiciones *in vivo* puede verse modificada por los mecanismos de distribución y biotransformación de los compuestos luego de pasar por el tracto digestivo (Moreno *et al.*, 2010), además de otros factores que pueden alterar la efectividad de los extractos crudos en pruebas *in vivo* sobre NGL.

En resumen, la evaluación de los extractos de las líneas transformadas RPWa1 y RPWa2 no presentó el efecto letal esperado, sin embargo, considerando que algunos productos antihelmínticos sólo causan daño en estadios endoparásitos (p.e. imidazotiazoles) (Köhler, 2001), podría ser el caso también de estos extractos. Así mismo, una evaluación en combinación de ambos extractos podría aumentar su actividad antihelmíntica. No sabemos si la actividad nematicida se debe a un compuesto o a un grupo de compuestos u otros mecanismos y/o interacciones, lo que es importante considerar al utilizar extractos crudos, y es posible que el metabolito con efecto letal en estos cultivos esté en menor proporción. Los extractos más activos evaluados en las pruebas *in vitro* e *in vivo* generan buenas perspectivas para una investigación más profunda que permita la identificación y purificación de los compuestos responsables de la actividad nematicida y evaluarlos por separado, con el fin de validar nuestros resultados y el potencial de *W. americana* para controlar enfermedades parasitarias en pequeños rumiantes.

## 9. CONCLUSIONES

- A las 72 horas el efecto antihelmíntico *in vitro* del extracto hexánico de raíz fue del  $62.15 \pm 9.68\%$  y del metanólico de hoja de  $48.51 \pm 10.07\%$ , ambos aplicados a una concentración de 50 mg/mL.
- El mejor efecto antihelmíntico de los cultivos de raíces pilosas se presentó en los extractos hexánicos de las líneas RPWa2 y RPWa1, alcanzando una mortalidad del  $14.38 \pm 3.44\%$  y  $13.67 \pm 1.14\%$ , respectivamente. Sin embargo, esta actividad no fue significativa ( $P < 0.0001$ ) comparada con los extractos más activos.
- Se comprobó el efecto nematicida de la planta silvestre en ensayos *in vivo*, empleando jerbos. El extracto hexánico de raíz reduce la carga parasitaria en un 59.4%, el metanólico de hoja en un 46.6% y el diclorometánico de raíz en un 28.1%.
- En el extracto hexánico de raíz se identificaron compuestos como: alcaloides, cumarinas, saponinas, triterpenos/ esteroides y taninos, y en el extracto metanólico de hoja se indica la presencia de flavonoides y alcaloides, saponinas y triterpenos/ esteroides.
- Mediante resonancia magnética nuclear- $^1\text{H}$ , se identificaron flavonas, triterpenos, sacáridos y ácidos grasos en el extracto metanólico de hoja, así como la presencia de glucósidos, flavonas, terpenos y ácidos grasos en el extracto hexánico de raíz.

## 10. PERSPECTIVAS

- Realizar más estudios que incluyan la purificación de los extractos de las raíces pilosas y evaluarlas por separado y en combinación.
- Someter los cultivos de RP a elicitación o bien cambios en los nutrientes del medio que puedan generar cambios en la producción metabólica y posibilitando la producción de metabolitos con actividad antihelmíntica en los cultivos.
- Identificar y purificar los metabolitos secundarios con actividad antiparasitaria de la raíz y la hoja de planta silvestre y evaluarlos por separado.
- Evaluar la actividad nematocida *in vivo* de los extractos hexánico de raíz y metanólico de hoja, utilizando como modelo pequeños rumiantes para evaluar la reducción de la carga parasitaria y la fertilidad y la fecundidad.
- Evaluar los extractos del presente estudio frente a otras especies de NGI que afectan a los sectores de salud pública y animal *in vitro*, donde se pueda demostrar una mejor actividad de la planta silvestre, así como de los cultivos de RP.
- 
- Realizar otro tipo de extractos utilizando diferentes solventes a los del presente proyecto, y evaluar su actividad antihelmíntica.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Akhgari, A., Yrjonen, T., Laakso I., Vuorela, H., Caldentey, K., Rischer, H., 2015. Establishment of transgenic *Rhazya stricta* hairy roots to modulate terpenoid indole alkaloid production. *Plant Cell Rep.*, 34(11), 1939-1952.
- Anziani, O.S; Fiel, C.A., 2015. Resistencia a los antihelmínticos en nematodos que parasitan a los rumiantes en la argentina. *RIA. Rev. investig. agropecu.* 41 (1).
- Angulo-Cubillán, F. J., García L., Cuquerella M., Fuente C., Alunda J. M., 2007. *Haemonchus contortus*-SHEEP RELATIONSHIP: A REVIEW. *Revista científica, FCV-Luz*, 6, 577-587.
- Arias, M., Aguirre, A., Angarita, M., Montoy, C., Retrepo, J. J., 2008. Aspectos ingenieriles del cultivo *in vitro* de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios. *Dyna*, 157, 109-121.
- Arias, Z. M., Angarita V. M., Aguirre C. A., Restrepo F. J., Montoya V. C., 2009. Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales. *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín*, 62, núm. 1, 4881-4895.
- Athanasiadou S and Kyriazakis I., 2004. Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. *Proceedings of the Nutrition Society*, 63, 631–639.
- Berke Z., Laurenson Y., Forbes A., Kyriazakis I., 2016. Modelling the consequences of targeted selected treatment strategies on performance and emergence of anthelmintic resistance amongst grazing calves. *Int J Parasitol: Drug & Drug Resistance*, 6, 258-71.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009, información disponible on-line en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Tapacola&id=7772>.
- Bivadi, V., Zakaria, A., Zare, N., Yazdani, B., 2014. Effects of different tissue culture conditions in hairy roots induction in *Hypericum perforatum* L. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 7(9), 645-652.
- Borokini, T., Omotayo, F., 2012. Phytochemical and ethnobotanical study of some selected medicinal plants from Nigeria. *Journal of Medicinal Plants*, 6, 1106-1118.
- Campos, R.R., & Bautista G.R., (1989) Diagnóstico de helmintos y hemoparásitos de rumiantes. Jiutepec, Asociación Mexicana de Parasitología Veterinaria A.C.
- Cantón C., Buffarini M., Alvarez L., Domínguez P., Cantón L., Ceballos L., Moreno L., Lanusse C., 2017. Eficacia clínica de la combinación ivermectina-ricobendazole en bovinos en un escenario de resistencia antihelmíntica múltiple. *Memoria técnica*, 79-82.

Chandra, S., 2012. Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: tole of T-DNA in plant secondary metabolism. *Biotechnol Lett*, 34, 407-415.

Conabio.gob.mx. (2015). *Waltheria indica* - ficha informativa. [online] Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/sterculiaceae/waltheria-indica/fichas/ficha.htm>.

Cretton, S., Breant, L., Pourrez, L., Ambuehl, C., Marcourt, L., Ebrahimi, N., Hamburger, M., Perozzo, R., Karimou, S., Kaiser, M., Cuendet, M., Christen, P., 2014. Antitrypanosomal quinoline alkaloids from the roots of *Waltheria indica*. *Journal of Natural Products*, 77, 2304-2311.

Cretton, S., Bréant, L., Pourrez, L., Ambuehl, C., Perozzo, R., Marcourt, L., Christen, P., 2015. Chemical constituents from *Waltheria indica* exert *in vitro* activity against *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Fitoterapia*, 105, 55-60.

Cretton, S., Dorsaz, S., Azzollini, A., Favre-Godal, Q., Marcourt, L., Ebrahimi, S., Voinesco, F., Michellod, E., Sanglard, D., Katia Gindro, K., Wolfender, J., Cuendet, M., Christen P., 2016. Antifungal Quinoline Alkaloids from *Waltheria indica*. *Journal of Natural Products*, 79, 300-307.

Dimayuga E., Murillo R. and Pantoja M., 1987. Traditional medicine of Baja California Sur (México) II. *Journal of Ethnopharmacology*, 20, 209-222.

Dimayuga, E., Garcia, K., 1991. Antimicrobial screening of medicinal plants from baja california sur, Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, 31, 181- 192.

Encalada, L., Tuyub, H., Ramirez, G., Mendoza, P., Aguilar, L., López, M., 2014. Phenotypic and genotypic characterisation of *Haemonchus spp.* and other gastrointestinal nematodes resistant to benzimidazole in infected calves from the tropical regions of Campeche State, Mexico. *Veterinary parasitology*, 205(1), 246-254.

Flatie, T., Gedif, T., Asres, K., Gebre-Mariam, T., 2009. Ethnomedical survey of Berta ethnic group Assosa Zone, Benishangul-Gumuz regional state, mid-west Ethiopia. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 5(1), 14.

Garba, S., Salihu, L., Ahmed, U., 2012. Antioxidant and antimicrobial activities of ethanol and N-hexane extract of *Waltheria Indica* and *Macuna Pruriens*. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, 1, 5-8.

García, C., 2016. Establecimiento de cultivos de raíces pilosas de *Waltheria americana* Linn. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Tesis de Licenciatura, pp. 20-30.

García, D.E., Soca, M., Medina, M.G., 2005. Acción antihelmíntica de seis extractos de morera en la viabilidad de larvas infestantes (L3) de nemátodos gastrointestinales. *Pastos y Forrajes*, vol. 28(4), 319-328.

- Georgiev, I., Radziszewska, A., Neumann, M., Marchev, A., Alipieva, K., Ludwig-Muller, J., 2015. Metabolic alterations of *Verbascum nigrum* L. plants and SAARt transformed roots as revealed by NMR-based metabolomics. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 123:349–356.
- Ghorbani, M., Ghorbani, A., Omid, M., Hashemi, M., 2015. Response Surface Modelling of Noradrenaline Production in Hairy Root Culture of Purslane (*Portulaca oleracea* L.). *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 3(6): 439-443.
- Graham, J., Quinn, M., Fabricant, D., Farnsworth, N., 2000. Plants used against cancer – an extension of the work of Jonathan Hartwell. *Journal of Ethnopharmacology*, 73(3), 347–377.
- Gutiérrez V., 2014. Análisis del efecto antiviral de *Waltheria americana* L (Standley y Steyermark, 1949) en el proceso infectivo de rotavirus humano sobre células MA 104. Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Ciencias Biológicas. Tesis de maestría, pp. 10-16.
- Hamidu, L., Ayo, O., Adelaiye, A., Abubakar, M., 2008. Sedative and anticonvulsant effects of ethyl acetate fraction of *Waltheria indica* in mice. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 3, 261-266.
- Hernández, R. N., Saucedo A. S., Cuéllar C. A., Álvarez R. B., Moya, L. D., 2009. Actividad antimicrobiana de *Waltheria indica* y *Acacia farnesiana*. *Revista CENIC., Ciencias Biológicas*, vol. 40, núm. 2, 129-134.
- Hernández, B. G., 2017. Análisis del perfil metabolómico identificación de productos antihelmínticos de *Lusiloma latisiliquum* Benth. (Tzalam). Tesis de doctorado, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.
- Igwebuike, E. V., Ahamefule, O. F., & Obododike, E. C., 2017. Standardization and evaluation of anticonvulsant activities of leaf extract and fractions of *Waltheria indica* (Baudilio)(Malvaceae). *Asian Pac. J. Health Sci.*,4(2):61-75.
- Isman, M., 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, 51: 45-66.
- Insunza V., Aballay E. and Macaya J., 2001. *In vitro* nematocidal activity of aqueous plant extracts on Chilean populations of *Xiphinema americanum sensu lato*. *Nematropica* 31,1, 47-54.
- Jang, J., Dang Q., Choi Y., Choi G., Jang K., Cha B., Luu N., and Kim J., 2015. Nematicidal activities of 4-quinolone alkaloids isolated from the aerial part of *Triumfetta grandidens* against *Meloidogyne incognita*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 1, 68-74.
- Jang J., Dang Q., Choi G., Park H., 2019. Control of root-knot nematodes using *Waltheria indica* producing 4-quinolone alkaloids. *Pest Management Science*.  
<https://doi.org/10.1002/ps.5363>.

- Jansen, O., Angenot, L., Tits, M., Nicolas, P., P. De Mol, Nikiema, B., Frederich, M., 2010. Evaluation of 13 selected medicinal plants from Burkina Faso for their antiplasmodial properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 130, 143-150.
- Javitt, J. M., Cutullé, C., Beltrao, M. M., Solana, H., 2013. Importancia, prevención y control de las helmintiasis que afectan principalmente a pequeños productores de ganado en Latinoamérica. *Rev Salud Anim.* vol.36 (3).
- Köhler, P., 2001. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal for Parasitology*, 31 (4), 336-345.
- Koné W., Atindehou K., Dossahoua T., Betschart B., 2005. Anthelmintic Activity of Medicinal Plants Used in Northern Côte d'Ivoire Against Intestinal Helminthiasis. *Pharmaceutical Biology*, 43, 1, 72–78.
- Kumar, V., Desai, D., Shriram, V., 2014. Hairy root induction in *Helicteres isora* L. and production of diosgenin in hairy roots. *Nat. Prod. Bioprospect*, 4, 107–112.
- Kumari, A., Baskaran, P., Van Staden, J., 2015. Enhanced HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitory and Antibacterial Properties in Callus of *Catha edulis* Forsk. *Phytotherapy Research*, 29(6), 840-843.
- Leonard, D., 2006. *Medicine at your feet: healing plants of the Hawaiian kingdom*. 1. Roast Duck Productions, US.
- Leonti, M., Vibrans, H., Sticher, O., Heinrich, M., 2001. Ethnopharmacology of the Popoluca, Mexico: an evaluation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 53: 1653-1669.
- Liébano, H. E., López A. M. E., De Gives, M. P., Marcelino, A. L., 2011. Manual de diagnóstico para la identificación de larvas de nematodos gastrointestinales en rumiantes. Centro nacional de investigación disciplinaria en parasitología veterinaria, publicación especial n. 2. 48.
- López A. M. E., De Gives, M. P., Marcelino, A. L., Liébano, H. E., 2010. Buenas prácticas en el manejo de antihelmínticos para el control de parásitos en rumiantes. Centro nacional de investigación disciplinaria en parasitología veterinaria, folleto técnico n. 8. 38.
- Lorence, A., Bolivar, F., Nessler, C., 2004. Camptothecin and 10-hydroxycamptotecin from *Camptotheca acuminata* hairy roots. *Physiology and Biochemistry*, 22, 437-441.
- Maheswara, M., Rao, K., Rao, M., Rao, V., 2006. Antibacterial activity of acylated flavonol glycoside from *Waltheria indica*. *Asian journal of chemistry*, 18(4), 2761-2765.
- Makhzoum, A., Sharma, P., Bernards, M., Trémouillaux-Guiller, J., 2013. Hairy roots: an ideal platform for transgenic plant production and other promising applications. In *Phytochemicals, Plant Growth, and the Environment*, pp. 95-142.

Marie M., Hoste H., Mahieu M., Varo H., Archimede H., 2009. *In vitro* effects of *Cucurbita moschata* seed extracts on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 161, 99–105.

Maregiani, G., Zamuner, N., Angarola, G., 2010. Efecto de extractos acuosos de dos meliaceas sobre *Meloidogyne incognita* (Nematoda, Meloidogynidae). *Rev. latinoam. Quím.*, 38 (1).

Mekkonen, S., 2007. Helminth parasites of sheep and goats in Eastern Ethiopia, Epidemiology, and Anthelmintic Resistance and its. Swedish University of Agricultural Sciences, (Doctoral dissertation).

Mendoza-de Gives P., 1998. Biological control of *Haemonchus contortus* infective larvae in ovine faeces by administering an oral suspension of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to sheep. *Journal of Helminthology*, 72, 343–347.

Mitchell, S., Ahmad, M., 2006. A review of medicinal plant research at the University of the West Indies, Jamaica, 1948- 2001. *West Indian Medical Journal*, 55, 243–269.

Mohammed, Z., Shok, M., Ilyas, N., Musa, K., Yaro, A., 2007. Analgesic activity of *Waltheria indica* linn. *European Journal of Scientific*, 16, 6-9.

Mongalo, N., Opaku, A., Zobolo, A., 2012. Antibacterial and antioxidant activity of the extracts of *Waltheria indica* Linn. Collected from Capricorn District, Limpopo Province, South Africa. *Journal of Medicinal Plants*, 6, 5593-5598.

Mongalo, N., McGaw, L., Finnie, J., Van Staden, J., 2017. Pharmacological properties of extracts from six South African medicinal plants used to treat sexually transmitted infections (STIs) and related infections. *South African Journal of Botany*, 112, 290-295.

Monroy Ortiz., Castillo España., 2007. Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos: CONABIO.

Monteillier, A., Cretton, S., Ciclet, O., Marcourt, L., Ebrahimi, S., Christen, P., Cuendet, M. 2017. Cancer chemopreventive activity of compounds isolated from *Waltheria indica*. *Journal of Ethnopharmacology*, 203, 214-225.

Moreno, FC., Gordona, IJ., Wrightc AC., Benvenuttia, MA., Saumellb CA. 2010. Efecto antihelmíntico *in vitro* de extractos de plantas sobre larvas infectantes de nematodos gastrointestinales de rumiantes. *Arch Med Vet*, 42, 155-163.

Mundo J., 2012. Evaluación del efecto sobre el sistema gaba-érgico de extractos de planta silvestre y suspensiones celulares de *Waltheria americana* linn. Tesis doctoral, Universidad autónoma del estado de Morelos, 70.

- Mundo, J., España, P., Villafuerte, M., Camacho, C., Rivera, I., Garcia, J., Perea, I., 2015. Methanolic extracts from roots and cell suspension cultures of *Waltheria americana* Linn induce GABA release in cerebral slices of mouse brain. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 9(5), 139-144.
- Mundo, J., Villeda, J., Herrera, M., Villafuerte, M., Arellano, J., León, I., Perea, I., 2017. Neuropharmacological and neuroprotective activities of some metabolites produced by cell suspension culture of *Waltheria americana* Linn. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, 129-139.
- Munguía, J.A., Valenzuela M.W., Leyva, C.J., Morales-P. M., Figueroa-C. J., 2013. Potencial del orégano como alternativa natural para controlar *Haemonchus contortus* en ovinos de pelo. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 9 (1): 150-154.
- Ochoa, R., 2012. Bovine Farms With Gastrointestinal Nematodes Resistant to Albendazole (Benzimidazoles) in Mexico. *REVISTA CIENTIFICA*, 22(4).
- Olajuyigbe, O., Babalola, E., Afolayan, J., 2011. Antibacterial and phytochemical screening of crude ethanolic extracts of *Waltheria indica* Linn. *African Journal of Microbiolog*, 5, 3760-3764.
- Olmedo, O., Azevedo, B., Tobal, E., 2015. Efecto de la concentración de ivermectina sobre el control de parásitos internos y el desempeño productivo de bovinos. *CIENCIA VETERINARIA*, 17 (1), 1515-1883.
- Oka, Y., Nacar, S., Putievsky, E., Ravid, U., Yaniv, Z., Spiegel, Y., 2000. Nematicidal Activity of Essential Oils and Their Components Against the Root-Knot Nematode. *Phytopathology*, 90 (7), 710-715.
- Osman, E., Elnima, I., Omer, A., 2013. Biological activity of methanolic extract of *Waltheria indica* roots. *ANSInet*, 13(6), 471-476.
- Paolini, V., Bergeaud J.P., C. Grisez, C., Prevot, F., 2003. Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 113, 253–261.
- Paolini, V., Fouraste, I., Hoste, H., 2003. In vitro effects of three woody plant and sainfoin extracts on 3rd-stage larvae and adult worms of three gastrointestinal nematodes. *Parasitology*, 129 (1), 69-77.
- Paolini, V., Frayssinesa, A., Farge, F., Dorchiesa, P., Hoste, H., 2003. Effects of condensed tannins on established populations and on incoming larvae of *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta* in goats. *Vet. Res.* 34, 331–339.
- Poné, J.W, Bilong C.F, Mpoame, M., 2009. *In vitro* nematicidal activity of extracts of *Canthium mannii* (Rubiaceae), on different life-cycle stages of *Heligmosomoides polygyrus* (Nematoda, Heligmosomatidae). *Journal of Helminthology*, 84, 156–165.

- Rao, K., Fang, H., Tzeng, M., 2005. Inhibitory effects of the flavonoids isolated from *Waltheria indica* on the production of NO, TNF- $\alpha$  and IL-12 in activated macrophages. pharmaceutical society of Japan 28, 912-915.
- Reginald, E., 2009. Biological surveys conducted on the Kapulena production well and reservoir site, Hmkua District, island of Hawaii. U.S. Fish and Wild life Service letter and biological survey report. Kapulena Production Well Biological Surveys.
- Reyes, D., López, M., González, R., Ramírez, G., Mendoza, P., Olazarán, S., Olmedo, A., 2016. Identificación del alelo B del gen de interferón gamma asociado al rechazo de la infección por *Haemonchus contortus* en corderos pelibuey. Quehacer Científico en Chiapas, 11 (2), 3-9.
- Rodríguez D., J. G., Arece, J., Javier L., Alemán, Y., 2015. Antihelmínticos, resistencia y método FAMACHA. Experiencia cubana en ovinos. Rev. Salud Anim., 37 (1) 57-63.
- Son-de F., Díaz A. M., Valles-de la Mora B., Capetillo C., 2012. *In vitro* anthelmintic activity of five tropical legumes on the exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. Experimental Parasitology, 131, 413–418.
- Spiegler, V., Liebau, E., Hensel, A., 2016., Medicinal plant extracts and plant-derived polyphenols with anthelmintic activity against intestinal nematodes. Nat. Prod. Rep., 34, 627-643.
- Shai, L., Masoko, P., Mokgotho, M., Magano, S., Mogale, A., Boaduo, N., Eloff, J., 2010. Yeast alpha glucosidase inhibitory and antioxidant activities of six medicinal plants collected in Phalaborwa, South Africa. South African Journal of Botany, 76(3), 465-470.
- Taveira, N., Lima, J., Silva, R., Espinosa, M. M., & Martins, D., 2009. Levantamento etnobotânico de plantas popularmente utilizadas como antiúlceras e antiinflamatórias pela comunidade de Pirizal, Nossa Senhora do Livramento-MT, Brasil. Revista Brasileira de Farmacognosia, 19(1A), 130-139. Mariano Martinez Espinosa, Domingos Tabajara de Oliveira Martins.
- Villar D., 2007 Biological effects of Fenbendazole in rats and mice: a review. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, 46, 8–15.
- Wahby I., 2007. Aproximaciones biotecnológicas tendentes a la mejora del cañamo (*Cannabis sativa* L.): Obtención y cultivo de raíces transformadas. Transformación genética y regeneración *in vitro*. Tesis doctoral, 1, 264.
- Whittaker, J. H., Carlson, S. A., Jones, D. E., Brewer, M. T., 2016. Molecular mechanisms for anthelmintic resistance in strongyle nematode parasites of veterinary importance. Veterinary Pharmacology and Therapeutics.

- Wolstenholme, A., Fairweather, I., Prichard, R., Samson-Himmelstjerna, G., Sangster, N., 2004. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in parasitology*, 20(10), 469-476.
- Yu, K., Murthy, H., Hahn, E., Paek, K., 2005. Ginsenoside production by hairy root cultures of *Panax ginseng*: influence of temperature and light quality. *Biochemical Engineering Journal*, 23(1), 53-56.
- Youbare Ziebrou, M., Lompo, M., Ouedraogo, N., Yaro, B., Guissou, I., 2016. Antioxidant, analgesic and anti-inflammatory activities of the leafy stems of *Waltheria indica* L. (Sterculiaceae). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6 (02), pp. 124-129.
- Zamilpa, A., García-Alanís C., López-Arellano M.E., Hernández, V.M., Valladares C. V., Salinas, S. D., Mendoza-de Gives P., 2018. *Journal of Helminthology*, 1-6.
- Zerbo, P., Millogo-Rasolodimey, J., Nacoulma-Ouerdraogo, O., Van Damme, P., 2007. Contribution à la connaissance des plantes médicinales utilisées dans les soins infantiles en pays San, au Burkina Faso. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 1(3), 262-274.
- Zongo, F., Ribuot C., Boumendjel, A., Guissou, L., 2013. Botany traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Waltheria indica* L. Sys. *Waltheria americana*): A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 148, 14-26.
- Zongo, F., Ribuot, C., Boumendjel, A., Guissou, I., 2013. Bouguidage search of active compounds from *Waltheria indica* L. (Malvaceae) used for asthma and inflammation treatment in Burkina Faso. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 28, 323-330.
- Zapata M., Hoyos M., Moreno G., 2005. Acción de un campo magnético sobre un cultivo aireado de *saccharomyces cerevisiae*. *Interciencia*, 30, 7, 409-413.



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 08 de Mayo de 2019

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (Tutor principal)  
Dra. María Eugenia López Arellano  
Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa  
Dra. María del Rayo Sánchez Carbente

Tesis: "ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE EXTRACTOS DE PLANTA SILVESTRE Y RAÍCES PILOSAS DE *Waltheria americana* Linn."

Alumno que la presenta a revisión: **CARLOS ANDRES GARCIA ARCE**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

  
DRA. IRENÉ DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO



**Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología**



Cuernavaca, Morelos a 08 de Mayo de 2019

**COMITÉ DE REVISION DE TESIS**

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (Tutor principal)  
Dra. María Eugenia López Arellano  
Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa  
Dra. María del Rayo Sánchez Carbente

Tesis: "ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE EXTRACTOS DE PLANTA SILVESTRE Y RAÍCES PILOSAS DE *Waltheria americana* Linn."

Alumno que la presenta a revisión: **CARLOS ANDRES GARCIA ARCE**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

**VOTO**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

**ATENTAMENTE**

  
**DRA. MARÍA EUGENIA LOPEZ ARELLANO**



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 08 de Mayo de 2019

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (Tutor principal)  
Dra. María Eugenia López Arellano  
Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa  
Dra. María del Rayo Sánchez Carbente

Tesis: "ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE EXTRACTOS DE PLANTA SILVESTRE Y RAÍCES PILOSAS DE *Waltheria americana* Linn."

Alumno que la presenta a revisión: **CARLOS ANDRES GARCIA ARCE**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

## VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

  
DRA. MARIA DEL CARMEN GUTIERREZ VILLAFUERTE



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 08 de Mayo de 2019

**COMITÉ DE REVISION DE TESIS**

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (Tutor principal)  
Dra. María Eugenia López Arellano  
Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa  
Dra. María del Rayo Sánchez Carbente

Tesis: "ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE EXTRACTOS DE PLANTA SILVESTRE Y RAÍCES PILOSAS DE *Waltheria americana* Linn."

Alumno que la presenta a revisión: **CARLOS ANDRES GARCIA ARCE**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

**VOTO**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

**DRA. MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE**



**Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología**



Cuernavaca, Morelos a 08 de Mayo de 2019

**COMITÉ DE REVISION DE TESIS**

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (Tutor principal)  
Dra. María Eugenia López Arellano  
Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa  
Dra. María del Rayo Sánchez Carbente

Tesis: "ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE EXTRACTOS DE PLANTA SILVESTRE Y RAÍCES PILOSAS DE *Waltheria americana* Linn."

Alumno que la presenta a revisión: **CARLOS ANDRES GARCIA ARCE**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

**VOTO**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

**ATENTAMENTE**

**DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA**