



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

**“Hacia el desarrollo de un nuevo antiparasitario basado en  
células en suspensión de *Carica papaya*”**

**T E S I S**  
**PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES**

**P R E S E N T A**  
**M. en ASPYC. Cynthia Alejandra Guzmán Medina**

**Directora de Tesis: Dra. María Luisa Villareal Ortega**

**Co-directora de tesis: Dra. Edda Sciutto Conde**



Cuernavaca, Morelos

Enero, 2024

**Esta tesis fue desarrollada en:**

1. Laboratorio de Investigación en Plantas Medicinales, Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, dirigido por la Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

1. Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, dirigido por la Dra. Edda Sciutto Conde y Dr. Julio César Carrero Sánchez.



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
**BIOMÉDICAS**



2. Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, dirigido por la Dra. Nelly Martínez Villalobos, Universidad Nacional Autónoma de México.



## DEDICATORIA

A mis padres y hermana son mi mayor soporte y sin ustedes jamás hubiera llegado hasta aquí, gracias por su infinito amor, apoyo, sabiduría, guía y paciencia, ¡todos mis logros son suyos y gracias a ustedes los AMO!

¡A mi mayor bendición, mi niña hermosa MaFer por ti y para ti siempre estaré superándome te amo!

A mi compañero incondicional fuiste una pieza fundamental y gran soporte emocional y técnico en la recta final de este proyecto, agradezco tu amor, apoyo y paciencia, ¡te amo Gil!

A mi abuelita Lolita por siempre echarme porras y palabras de aliento, a mis tíos, tías, primos y primas Guzmán y Medina por su apoyo.

A mi nueva familia Morales Villafaña quienes me han recibido como otra hija y hermana, me han apoyado mucho y brindado su amor, los quiero y admiro mucho.

Familia Méndez Landa gracias por su gran apoyo y por ser parte de nuestra familia me siento muy agradecida que estén en nuestras vidas.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme llegar hasta donde estoy, brindarme salud, paciencia, sabiduría y perseverancia.

A los Laboratorios y departamentos de: Investigación en Plantas Medicinales CEIB, UAEM. Inmunología IIB y Patología, FMVZ, UNAM y Bioterio de SEDENA, por permitirme realizar el trabajo de investigación, formar parte de su grupo de trabajo y por todo el apoyo brindado durante mi proyecto.

A las Dras. María Luisa Villareal, Edda Sciutto Conde y Anabel Ortiz Caltempa por dirigir, apoyarme y orientarme en la elaboración del presente trabajo, gracias por la disposición y paciencia que siempre tuvieron con una servidora.

A los integrantes de mi comité tutorial, Dres. Liliana Aguilar Marcelino, Alexandre Cardoso Taketa, Ramón Suárez Rodríguez, José de Jesús Arellano García, Raúl Bobes Ruiz.

A la Dra. Marisela Hernández por todo el apoyo técnico, colaboración y asesorías con los experimentos *in vitro* e *in vivo* de este trabajo, así mismo para los Dres. Gladis Fragoso, Julio César Carreo y César Díaz del Departamento de inmunología, IIB, UNAM por su asesoría y colaboración en los ensayos.

A la Dra. Nelly Villalobos del laboratorio de Patología, FMVZ, UNAM por el gran apoyo otorgado durante todo el proyecto y en la realización de los experimentos, por siempre apoyarme sin importar la hora, el día o vacaciones y por abrirme camino para obtener material y equipo necesario, así como brindarme su espacio de trabajo para los experimentos, por ser mi apoyo, asesora, consejera y amiga desde el inicio del proyecto hasta la fecha, la quiero, estimo y admiro mucho, ¡¡¡GRACIAS INFINITAS!!!

A los Dres. José Juan Martínez, Patricia del Arenal, Tzipe Govsenski, Guadalupe Núñez, Georgina Díaz, IIB, UNAM por su apoyo y asesorías técnicas.

Al personal administrativo del CEIB, UAEM: Mto. Victor Martínez, Lic. Sandra Martínez, Mta. Rocío Rodríguez, Biol. Fernanda Cristina por el apoyo y asesoría con una servidora y al Ing. Jezer Ortiz† por su gran apoyo, pero sobre todo su amistad, nunca olvidare los días de la comida muertos de risa con nuestras ocurrencias, hasta siempre amigo!

A mis compañeros del Laboratorio: Chris, Nancy, Ely, Juanito, Charito, Leonel, Paloma y Mony por el apoyo y gratos momentos vividos y de la UAEM: Caleb, Marel, Ary, Sofie, Normiux, Mayra y a mis buenos e incondicionales amigos Mony Itzel y Migue, por tantos momentos de alegría y risas, ¡los quiero!

Al personal del bioterio de SEDENA: Mta Anahí Moncivais y Dr. Soto, por permitimos usar sus instalaciones durante la pandemia y apoyo del personal encargado Cadetes: Omar, Ariel y Reynold, para poder realizar los experimentos in vivo.

A mis amigos Sara Jiménez y Ricardo Uribe por creer en mi, siempre estar en cualquier momento y por su gran apoyo los quiero mucho.

A CONACYT por la beca otorgada y apoyo en la realización de este proyecto.

## Tabla de contenido

Listado de Figuras .....	8
Listado de Tablas .....	9
Listado de abreviaturas .....	10
Resumen .....	11
Abstract .....	12
1. Introducción.....	14
1.1 Alternativas biológicas para el control de parásitos gastrointestinales .....	14
1.2 Parásitos gastrointestinales con mayor impacto en salud animal.....	15
1.3 <i>Taenia crassiceps</i> .....	16
1.4 Ciclo de vida de <i>Taenia crassiceps</i> .....	16
1.5 <i>Entamoeba histolytica</i> .....	17
1.6 Ciclo de vida <i>Entamoeba histolytica</i> .....	17
2. Antecedentes .....	18
2.1 Cultivo in vitro de plantas transgénicas.....	21
2.2 Cultivos de callos embriogénicos .....	21
2.3 Características de las células en suspensión.....	21
2.4 Adaptación y crecimiento de callos (CF) y células en suspensión (SF) de <i>Carica papaya</i> no transformados (CF-WT) y transformados (CF-23).....	22
2.5 Justificación .....	24
2.6 Hipótesis .....	24
2.7 Objetivo General.....	24
2.8 Objetivos Específicos .....	24
3. Material y Métodos .....	25
3.1 Mantenimiento de callos y células en suspensión para la línea no transformada y transformada para la producción de biomasa de <i>C. papaya</i> .....	25
3.2 <i>Taenia crassiceps</i> .....	25
3.2.1 Evaluación del efecto de cultivos de <i>C. papaya</i> sobre <i>Taenia crassiceps</i> en roedores .....	25
3.2.2 Parásitos .....	25
3.2.3 Preparación del extracto soluble acuoso de callos embriogénicos y células en suspensión de <i>C. papaya</i> .....	26
3.2.4 Evaluación in vitro de cultivos celulares sobre cisticercos .....	26

3.2.5 Motilidad y viabilidad .....	26
3.2.6 Evaluación in vitro del efecto cisticida de extractos con solventes orgánicos sobre cisticercos de <i>T. crassiceps</i> .....	27
3.2.7 Preparación de los extractos orgánicos con cisticercos de <i>T. crassiceps</i> .....	27
3.3 Evaluación in vivo de <i>Taenia crassiceps</i> .....	28
3.3.1 Animales para el mantenimiento de los cisticercos .....	28
3.3.2 Animales para tratamiento .....	28
3.4 <i>Entamoeba histolytica</i> .....	28
3.4.1 Cultivos de <i>E. histolytica</i> .....	28
3.4.2 Ensayos in vitro .....	29
3.4.3 Protocolo de infección con parásitos y absceso hepático amebiano en hámsteres .....	29
3.4.4 Ensayos in vivo.....	30
3.5 Bienestar animal.....	30
4. Resultados .....	31
4.1 Evaluación in vitro de líneas celulares de <i>C. papaya</i> sobre cisticercos de <i>T. crassiceps</i> .....	31
4.2 Evaluación con los solventes orgánicos de los extractos SF-WT de <i>C.papaya</i> sobre cisticercos de <i>T. crassiceps</i> .....	37
4.3 Evaluación de <i>E. histolytica</i> in vitro .....	39
4.4 Evaluación del efecto in vivo de líneas de células en suspensión de <i>C. papaya</i> sobre cisticercos de <i>T.crassiceps</i> .....	40
4.5 Evaluación in vivo de líneas celulares de cultivos en suspensión de <i>C. papaya</i> contra <i>Entamoeba hystolitica</i> .....	43
5. Discusión.....	51
6. Conclusiones.....	54
7. Perspectivas.....	54
8. Referencias Bibliográficas.....	55
9. Anexos.....	58

## Listado de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Taenia crassiceps</i> .....	16
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i> . (Centro de Control y Prevención de Enfermedades CDC, 2017).....	17
Figura 3. Efecto de los fitorreguladores 2,4-D y cinetina sobre la línea CF-23 de <i>Carica papaya</i> , tomado de García, 2015.....	22
Figura 4. Adaptación de células en suspensión. Efecto de los fitorreguladores 2,4-D y cinetina sobre la línea SF-23 de <i>Carica papaya</i> , tomado de Pérez, 2019 .....	23
Figura 5. Curvas de crecimiento, cultivo de células en suspensión línea SF-23 y SF-WT <i>C. papaya</i> (Pérez, 2019) .....	23
Figura 6. Imagen de viabilidad por Azul Tripán a las 96 horas .....	31
Figura 7. Imagen de viabilidad de cisticercos de callos de papaya CF-WT .....	33
Figura 8. Imagen de viabilidad de cisticercos CF-23.....	34
Figura 9. Cisticercos teñidos con Azul Tripán a una concentración de 10mg/mL de los extractos acuosos preparados a partir de callos o de células en suspensión no transformadas.....	35
Figura 10. Efecto cisticida de líneas de callos y células en suspensión de <i>C. papaya</i> .....	36
Figura 11. Evaluación del efecto cisticida de SF-WT de <i>C. papaya</i> con acetato de etilo..	38
Figura 12. Evaluación del efecto cisticida de SF-WT de <i>C. papaya</i> con n-hexano .....	38
Figura 13. Efecto amebicida de líneas de células en suspensión de <i>C. papaya</i> .....	39
Figura14. Grupo control con PBS .....	43
Figura15. Grupo control con Metronidazol .....	44
Figura16. Grupo SF-WT 10 mg.....	44
Figura17. Grupo SF-WT 20 mg.....	45
Figura18. Grupo SF-WT 10mg + MTZ .....	45
Figura19. Grupo SF-WT 20mg + MTZ .....	46
Figura 20. Grupo control PBS .....	46

Figura 21. Grupo control Metronidazol .....	47
Figura 22. Grupo SF-23 10 mg .....	47
Figura 23. Grupo SF-23 20 mg .....	48
Figura 24. Grupo Figura 22. Grupo SF-23 10 mg.....	48
Figura 25. Grupo control PBS .....	49
Figura 26. Grupo control con Metronidazol .....	49
Figura 22. Grupo SF-WT 10 mg/mL.....	50

### Listado de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Publicaciones en la literatura que reportan a la papaya con actividad antiparasitaria. ....	19
<b>Tabla 2.</b> Preparación de extractos orgánicos sobre cisticercos de <i>T. crassiceps</i> .....	27
<b>Tabla 3.</b> Evaluación de motilidad y viabilidad de <i>T. crassiceps</i> a las 72, 96 y 120 horas de cultivo .....	31
<b>Tabla 4.</b> Efecto del extracto acuoso de callos de papaya transformados y no transformados sobre cisticercos de <i>T. crassiceps</i> a las 96 horas.....	32
<b>Tabla 5.</b> Efecto del extracto total de callos de papaya transformados y no transformados sobre cisticercos de <i>T. crassiceps</i> .....	33
<b>Tabla 6.</b> Evaluación del efecto del extracto de callos y de líneas de células en suspensión de papaya transformados y no transformados, sobre cisticercos de <i>T. crassiceps</i> .....	34
<b>Tabla 7.</b> Evaluación del efecto del extracto de callos y células de papaya no transformados y transformados sobre cisticercos de <i>T. crassiceps</i> .....	35
<b>Tabla 8.</b> Evaluación del efecto de extractos solubles de callos y células en suspensión de papaya transformados y no transformados sobre cisticercos <i>in vitro</i> .....	36
<b>Tabla 9.</b> Porcentaje de mortalidad de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> con diferentes extractos obtenidos a partir de células en suspensión WT de <i>C. papaya</i> .....	37
<b>Tabla 10.</b> Evaluación de amebas vivas en extractos solubles de células en suspensión de <i>C. papaya</i> .....	39
<b>Tabla 11.</b> Efecto <i>in vivo</i> de extractos solubles de SF-23 y SF-WT de <i>C. papaya</i> en concentraciones de 5 y 10mg/mL .....	40

<b>Tabla 12.</b> Efecto <i>in vivo</i> de extractos solubles de SF-23 y SF-WT de <i>C.papaya</i> a concentración de 10mg/mL.....	41
--	----

Los valores son el promedio de 7 ratones  $\pm$  DS. Evaluación por duplicado. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) con base a la Prueba de Tukey..... 41

<b>Tabla 13.</b> Efecto <i>in vivo</i> de extractos solubles de SF-23 y SF-WT de <i>C.papaya</i> contra antiparasitarios comerciales.....	42
---	----

<b>Tabla 14.</b> Efecto <i>in vivo</i> de extracto soluble de SF-WT de <i>C.papaya</i> .....	43
--	----

<b>Tabla 15.</b> Efecto <i>in vivo</i> de extracto soluble de SF-23 de <i>C.papaya</i> .....	46
--	----

<b>Tabla 16.</b> Efecto <i>in vivo</i> de extractos solubles de SF-WT y SF-23 de <i>C.papaya</i> .....	49
--	----

### Listado de abreviaturas

ADNc. Acido desoxirribonucleico complementario

CF Callo friable

SF Suspensiones friables

Línea silvestre o no transformada

B5 Medio de cultivo B5 de Gamborg

g Gramos

hrs Horas

$\mu$ M Micromolar

$\mu$ L Microlitros

L Litro

min Minutos

mg Miligramos

mL Mililitros

nm Nanometros

PS Peso seco

PF Peso fresco

PVP Polivinil pirrolidona

rpm Revoluciones por minuto

$t_d$  Tiempo de duplicación celular

$t_R$	Tiempo de retención
$\mu$	Velocidad específica de crecimiento ( $d^{-1}$ ).
$X_{PS}$	Concentración de biomasa en peso fresco ( $g_{PF} L^{-1}$ )
$X_{PF}$	Concentración de biomasa en peso seco ( $g_{PS} L^{-1}$ )
WT	Línea sin transformar
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2-4, D)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
PBS	Phosphate-buffered saline
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
DMSO	Dimetilsulfóxido
TYI-S-33	Keister's Modified TYI-S-33 Giardia Medium
KETc	Kaethe, Edda, <i>Taenia crassiceps</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction

## Resumen

Las enfermedades parasitarias son un problema de salud pública que afectan a más de la quinta parte de la población a nivel mundial. Además de la morbilidad que generan, sino son tratadas y controladas de manera adecuada pueden llegar a causar la muerte.

En el mercado existen diferentes antiparasitarios comerciales, que si bien son efectivos, presentan diferentes efectos adversos tanto para el individuo parasitado (i.e. destrucción de la microbiota intestinal) como para el medio ambiente. Este panorama señala la relevancia de desarrollar tratamientos antiparasitarios más amigables con el ambiente y con menores efectos adversos que estén disponibles actualmente en el mercado. Productos obtenidos a partir de plantas con propiedades anti-parasitarias, cultivadas *in vitro* en condiciones controladas, podrían representar una alternativa realista. Entre ellas figura la planta *Carica papaya*, especie de zonas tropicales y subtropicales del planeta a cuyos frutos se les adjudica actividades antiparasitarias. Estas propiedades se atribuyen a algunos de sus compuestos concentrados en el latex y en las semillas como la papaina, la quimiopapaina, la lisozima, la glicil-endopeptidasa, la proteasa de cisteína y el benzil-isotiocinato.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antiparasitaria *in vitro* e *in vivo* de un conjunto de callos y líneas de células de papaya de *Carica papaya* contra cisticercos de *Taenia crassiceps* (cestodo) y contra trofozoitos de *Entamoeba histolytica* (protozoario). Los extractos acuosos obtenidos a partir de callos y células cultivados en placa o en suspensión, respectivamente, de las diferentes líneas de papaya revelaron alta capacidad cisticida (>98% de mortalidad) *in vitro* contra cisticercos de *Taenia crassiceps*. En la evaluación *in vivo* la línea no transformada obtuvo mayor efecto cisticida a 10mg/mL reduciendo el número de cisticercos gemantes y aumentando los cisticercos calcificados en niveles similares a los obtenidos utilizando antiparasitarios comerciales (albendazol y niclosamida). Las líneas transformadas y sin transformar de papaya evaluadas indujeron una alta capacidad amebicida (97% de mortalidad) *in vitro* contra trofozoitos de *Entamoeba histolytica*. Las diferentes líneas transformadas y sin transformar de papaya redujeron significativamente el número de abscesos amebianos y previnieron la hepatomegalia de manera no significativamente diferente que el anti-parasitario comercial (metronidazol). Los resultados generados en el presente estudio señalan al extracto acuoso obtenido a partir de cultivos en suspensión de células de papaya transformada y no transformada indujeron alto nivel de protección *in vitro* e *in vivo* por lo tanto; este es un producto efectivo para el tratamiento de la cisticercosis y la amebiasis.

**Palabras clave:** *Carica papaya*, antiparasitario, células en suspensión, *T. crassiceps*, *E. histolytica*.

### **Abstract**

Parasitic diseases are a public health problem that affect more than a fifth of the population worldwide. Additionally, and along with the morbidity they produce, they can cause death if they are not treated and controlled adequately.

There are different commercial antiparasitics on the market which, although effective, present different adverse effects both for the individual (i.e., destruction of the intestinal microbiota) and for the environment alike. This panorama points out the relevance of developing more environmentally friendly antiparasitic treatments with fewer adverse effects than the ones currently available on the market. Products obtained from plants with antiparasitic properties, grown *in vitro* under controlled conditions, could represent a realistic alternative. Among them is the *Carica papaya*, a species from tropical and subtropical areas of the planet whose fruits are believed to have antiparasitic activities. These properties are

attributed to some of its compounds concentrated in the latex and seeds such as papain, chymopapain, lysozyme, glycy-endopeptidase, cysteine-proteinase and benzyl-isothiocyanate.

The objective of the present work is to evaluate the in vitro and in vivo antiparasitic activity of a set of papaya callus and cell lines from *Carica papaya* against cysticerci of *Taenia crassiceps* (cestode) and against trophozoites of *Entamoeba histolytica* (protozoan). The aqueous extracts obtained from callus and cells cultured in plates or in suspension, respectively, of the different papaya lines revealed high cysticidal capacity (>98% mortality) in vitro against *Taenia crassiceps cysticerci*. Meanwhile, in the in vivo evaluation, the non-transformed line obtained a greater cysticidal effect at 10 mg/mL, reducing the number of budding cysticerci and increasing calcified cysticerci at levels like those obtained using commercial antiparasitic (albendazole and niclosamide). The papaya lines evaluated induced a high amoebicidal capacity (97% mortality) in vitro against *Entamoeba histolytica trophozoites*. The different papaya lines significantly reduced the number of amoebic abscesses and prevented hepatomegaly in a non-significantly different manner than the commercial anti-parasitic (metronidazole).

The results produced in this thesis indicate that the aqueous extract obtained from suspension cultures of transformed and non-transformed papaya cells induced a high level of protection in vitro and in vivo. Therefore, this may represent an effective product for the treatment of cysticercosis and amoebiasis.

**Keywords:** *Carica papaya*, antiparasitic, in-suspension cells, *T. crassiceps*, *E. histolytica*.

## 1. Introducción

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a las enfermedades parasitarias como un problema de salud pública a nivel mundial, que perjudica la salud de personas de todas las edades, con mayor incidencia en niños a los que afecta en el crecimiento y en el desarrollo físico y mental (Sandoval, 2012). Una quinta parte de la población en el mundo está infectada con uno o más parásitos intestinales, siendo los más comunes en América-Latina *Áscaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Hymenolepis nana*, *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* (Fillot et al., 2015, Sandoval, 2012).

Las parasitosis gastrointestinales también afectan animales de producción para consumo humano ocasionando pérdidas a nivel mundial de más de \$5, 786 millones de pesos anuales y hasta de \$8,902 millones de pesos en México (Rodríguez et al., 2017). Actualmente, estas enfermedades se controlan mediante el uso de productos antihelmínticos. Si bien estas drogas han sido efectivas, el uso indiscriminado y constante de estos productos antihelmínticos (Bencimidazoles, Lactonas Macrocíclicas e Imidazotiazoles) ha desencadenado un problema de resistencia en particular en nematodos gastrointestinales de rumiantes (Fillot et al., 2015).

### 1.1 Alternativas biológicas para el control de parásitos gastrointestinales

Además del impacto de las parasitosis intestinales en la salud humana y en el área pecuaria, los parásitos afectan también la salud de los animales de compañía. Considerando que en su mayoría son enfermedades zoonóticas, se recomienda que los animales de compañía reciban un tratamiento anti-parasitario programado y frecuente para prevenir la transmisión de estas enfermedades a sus propietarios y convivientes (Sumaro y Ocampo, 2008). Este panorama ha estimulado la búsqueda y desarrollo de diversas alternativas de control de los parásitos gastrointestinales; así como el desarrollo de diversos fármacos antiparasitarios con miras a contribuir en la salud pública y animal, para poder controlar las zoonosis y limitar los costos que implican (Sumaro y Ocampo, 2008).

En este contexto, es evidente la relevancia de la búsqueda de alternativas sustentables y sostenibles para controlar la prevalencia de parasitosis gastrointestinales cuyos metabolitos no dañen el medio ambiente. Entre las alternativas posibles se han considerado el uso de productos naturales.

Las propiedades que debe tener un producto antiparasitario son: 1) amplio margen terapéutico, 2) disponibilidad de antídoto para casos de sobredosis, 3) efecto potente y rápido, 4) efecto residual bien definido y de preferencia prolongado, 5) baja toxicidad, 6) razón costo-benéfico rentable, 7) amplio espectro antiparasitario, 8) baja incidencia y gravedad de problemas causados por los residuos en productos de origen animal, 9) fácil administración, 10) baja o nula generación de resistencia, 11) escaso o nulo efecto sobre el ecosistema (Sumaro y Ocampo, 2008). Entre los productos posibles se han evaluado con éxito diferentes componentes de la papaya como son: papaina, quimiopapaina, lisosima, glicil-endopeptidasa, cistein-proteinasa y el benzil-isotiocinato a los que se ha demostrado propiedades antiparasitarias (Buttle, 2011).

## **1.2 Parásitos gastrointestinales con mayor impacto en salud animal**

Los parásitos de mayor importancia médica o veterinaria se clasifican principalmente en nemátodos y los platelmintos, (gusanos planos con simetría bilateral) de estos últimos, Trematoda y Cestoidea (por la presencia de ventosas y ganchos). En la actualidad dentro de las enfermedades de mayor preocupación a nivel mundial se encuentran las parasitarias (Tappe, et al., 2015).

Los platelmintos son gusanos planos, morfológicamente los platelmintos son aplanados dorsoventralmente y tienen simetría bilateral, su cuerpo es blando y no presentan segmentación. La mayoría de ellos tienen un tamaño microscópico y los que son más grandes son extremadamente finos. Los platelmintos presentan diferencias morfológicas y fisiológicas dependiendo del medio que habiten ya que sus cuerpos están totalmente adaptados a los diferentes hábitats. Se distinguen dos tipos formas de vida: los de vida libre y los parásitos (Tappe, et al., 2015).

Los cestodos son helmintos largos, que se denominan tenias. por su aspecto y forma exagerada de provocar la pérdida de peso, son mejor conocidos como gusanos intestinales. cuando un humano sirve como el hospedero definitivo para tenias, tiene pocas consecuencias para la persona; la forma intestinal de estas pocas veces causa daño grave. Entre los de mayor importancia se encuentran los de la familia Taeniidae, como: *T. asiática*, *T. crassiceps*, *T. serialis*, *T. saginata* y *T. solium* (Tappe, et al., 2015). Los parásitos de mayor importancia médica o veterinaria corresponden principalmente a los grupos de nemátodos y platelmintos. Los parásitos intestinales de interés seleccionados para este

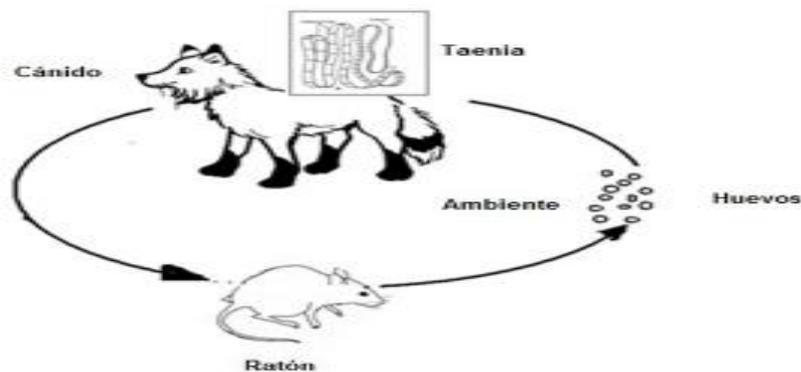
trabajo son: *Taenia crassiceps* y *Entamoeba histolytica*, considerando la posibilidad de contar con formas de ambos parásitos que pueden mantenerse *in vivo* e *in vitro* en los que evaluar la capacidad antiparasitaria de diferentes productos.

### 1.3 *Taenia crassiceps*

Este cestodo presenta abundantes similitudes genéticas y antigénicas con *Taenia solium*. Considerando estas similitudes, el modelo experimental murino por *Taenia crassiceps* se ha utilizado extensamente para desarrollar vacunas y procedimientos diagnósticos, así como para evaluar la participación de factores biológicos que intervienen en la enfermedad, con miras de orientar el conocimiento para *Taenia solium* que es el parásito que afecta al humano (Willms *et al.*, 2010).

### 1.4 Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*

Como se muestra en la Figura 1. El cánido se infecta al consumir presas infectadas, dentro del se presenta la etapa adulta del gusano y la propagación del parásito por reproducción asexual de la que se obtienen los cisticercos que son liberados en las heces del canido, posteriormente se alojan dentro de los roedores que son el hospedero intermedio y al reproducirse asexualmente, al ser ingerido por otro animal, comienza nuevamente el ciclo (Rangel 2011).



**Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps***

- A) El canido (huésped definitivo) se infecta al consumir presas infectadas;
- B) Se desarrolla la etapa adulta del gusano en el intestino del huésped;
- C) Huevos infecciosos liberados por el huésped;
- D) Los huevos son ingeridos por el roedor (huésped intermediario);
- E) Las larvas crecen dentro del huésped intermediario y son ingeridos por un huésped definitivo. (Aluja *et al.*,2001, Núñez *et al.*,2018).

### 1.5 *Entamoeba histolytica*

Es un protozoo patógeno para el ser humano y para los cánidos, que causa la amebiasis. Las personas infectadas pueden manifestarse de forma asintomática o sintomática, siendo la mayoría de las veces asintomática; sin embargo, cuando se producen infecciones invasivas, se presentan consecuencias graves para el huésped (Kantor, *et al.*, 2018).

### 1.6 Ciclo de vida *Entamoeba histolytica*

Como se muestra en la Figura 2. Durante su ciclo de vida presenta dos morfologías: trofozoítos y quistes. Los trofozoítos contienen un núcleo único, con un diámetro de 20-40  $\mu\text{m}$ . Los quistes son de 10 a 16  $\mu\text{m}$  de diámetro, con cuatro núcleos cuando están maduros, un sólo núcleo cuando están inmaduros, con glucógeno en una vacuola y a menudo con cuerpos cromáticos. El núcleo de los quistes es vesicular, esférico, con una membrana revestida con pequeños gránulos de cromatina y con un pequeño cariosoma, esférico y central (Barron González., 2007).

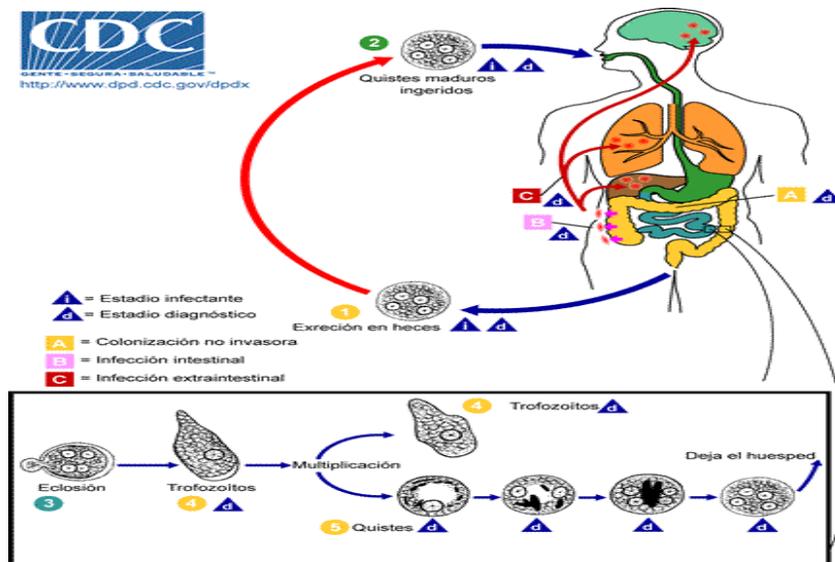


Figura 2. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*. (Centro de Control y Prevención de Enfermedades CDC, 2017)

1.-Los quistes maduros tetranucleados son eliminados a través de las heces y son ingeridos a través de agua o alimentos contaminados, 2.-E1 desenquistamiento ocurre en el intestino delgado, 3.-A partir de cada quiste emergen ocho trofozoítos metaquísticos, 4.-A nivel de colon descendente ocurre el enquistamiento, los trofozoítos que atraviesan la mucosa intestinal (B) pueden diseminarse vía porta (C) al hígado, pulmón o cerebro y ocasionar amebomas. Tomado de (Barron González., 2007).

## 2. Antecedentes

Si bien existen en el mercado productos que presentan algunas de las propiedades mencionadas, los actualmente disponibles comercialmente, causan distinto grado de daño a la mucosa intestinal, alteraciones importantes de la microbiota, causan daño al medio ambiente modificando la flora y fauna y se ha comenzado a notificar resistencia a los mismos (Alparo, 2005).

Considerando las limitaciones de los antiparasitarios actualmente disponibles y el impacto de los parásitos intestinales en la salud humana y animal, la búsqueda de nuevos antiparasitarios en particular aquellos de origen natural ha cobrado gran interés a nivel mundial (Luyando, 2012). Entre ellos se ha explorado el uso de la papaya (*Carica papaya*) (Kaur, 2017).

La papaya es una fruta cultivada en zonas tropicales y subtropicales, sus árboles producen todo el año fruta de alta capacidad nutricional y se le han adjudicado diferentes aplicaciones medicinales (Kaur, 2017). Las propiedades antiparasitarias se han atribuido a algunos de sus componentes entre los que figura la papaina, quimiopapaina, lisozima, glicil endopeptidasa, cistein proteinasa y benzil isotiocinato; compuestos concentrados en el látex y en las semillas de papaya, en la **Tabla 1** podemos ver los resultados al respecto de la capacidad antiparasitaria de la papaya en diferentes estudios realizados en distintas especies animales (Luyando, 2012).

**Tabla 1.** Publicaciones en la literatura que reportan a la papaya con actividad antiparasitaria.

<b>Especie</b>	<b>Parasito</b>	<b>Componente</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referencia</b>
Cerdos	<i>Ascaris suum</i>	Látex crudo de papaya	Reducción 43% de parásitos en heces 7 días post-tratamiento y sin efectos adversos.	Satrija <i>et al.</i> , (1995)
Ratón	<i>Trichuris muris</i>	Látex crudo de papaya. Quimiopapaína	Reducción del 56% de parásitos en heces. No hay efecto contra parásitos	Stepek-Buttle <i>et al.</i> , (2007)
Ovino	<i>Haemonchus contortus</i>	Suspensión de látex	Reducción 61% de parásitos	Buttle <i>et al.</i> , (2011)
Ratón /Rata	<i>Hymenolepis</i>	Sobrenadante de látex	Reducción 78% de parásitos	Luoga <i>et al.</i> , (2015)

Por otro lado, la papaya se ha utilizado en nuestro grupo de investigación exitosamente como vehículo de expresión de proteínas recombinantes. Se han expresado los antígenos contra la cisticercosis porcina S3Pvac exitosamente (Hernández, *et al.*, 2010). Esta vacuna está constituida por tres péptidos denominados KETc7, KETc1 y KETc12. La vacuna S3Pvac se generó en una primera versión en forma sintética inyectable, demostrando su capacidad protectora para prevenir la cisticercosis porcina en condiciones naturales de transmisión (Huerta *et al.*, 2001). Para la realización de la vacuna contra la cisticercosis (S3Pvac), se decidió emplear en la elaboración los tres péptidos, siendo clonas transgénicas KETc1, KETc7, KETc12, los últimos dos fueron modificados al añadirle en el extremo 3' un grupo de ácido carboxílico (COOH) terminal, este codifica seis residuos de histidina. Para el ADNc (complementario) y secuencias que codifican el péptido KETc7 se utilizó un vector de transformación pUI235-5.1 para introducir las clonas dentro del material transgénico vegetal.

Se transformaron callos embriogénicos de diferentes especies, tales como: zanahoria (*Daucus carota* *vr. nantes*), papaya (*Carica papaya* *vr. maradol*), maíz (*Zea mays*, línea LPC-13) y sorgo (*Sorghum bicolor*). Todas las clonas obtenidas se propagaron por cultivo *in vitro* y después de analizar las ventajas y desventajas de cada especie en cuanto al crecimiento y eficiencia de transformación, se seleccionó la de *Carica papaya*.

Posteriormente se realizó la caracterización molecular e inmunológica de 53 clonas transgénicas de papaya, (38 codifican al péptido KETc7.6His, 11 para KETc12.6His y 4 para KETc7). Estas clonas se evaluaron en su capacidad protectora contra cisticercosis murina y con base en esto, se seleccionó la clona para cada uno de los antígenos mencionado que inducía los más altos niveles de protección contra la cisticercosis (Hernández, *et al.*, 2010).

Con el propósito de reducir el costo de producción de esta, se generó una segunda versión expresada en fago recombinante denominada S3Pvac-fago (Manoutcharian *et al.*, 2004). Ambas versiones confirmaron altas y similares capacidades protectoras en contra de la cisticercosis porcina en cerdos de traspatio (Huerta *et al.*, 2001; Morales *et al.*, 2008; 2010). Sin embargo, la aplicación inyectable en cerdos, que deambulaba libremente en comunidades rurales presenta dificultades logísticas para su aplicación masiva (Aluja *et al.*, 2014). Con el propósito de desarrollar una vacuna oral que pudiera ser aplicada por el mismo productor sin las mencionadas complicaciones logísticas y de bajo costo, se evaluaron las clonas expresadas en papaya como vacuna contra cisticercosis murina y porcina (Fragoso *et al.*, 2011).

Se decidió la expresión en plantas considerado las evidencias que indican que las plantas son un vehículo idóneo para la administración oral que permiten la producción en alta cantidad, no requieren purificaciones del producto, no requiere red de frío, contienen componentes que pueden proteger y aún aumentar la inmunogenicidad de los antígenos expresados, siendo esto una ventaja. Entre el interés de utilizar el sistema de papaya como sistema de expresión consiste en la capacidad intrínseca antiparasitaria de componentes de la papaya (Stepek-Buttle *et al.*, 2007).

Los tres componentes de S3Pvac expresados en callos embriogénicos de papaya (Hernández *et al.*, 2007) demostraron inducir un alto nivel de protección contra la cisticercosis experimental murina y cunícula administrada (Fragoso *et al.*, 2017; Betancourt *et al.*, 2012). S3Pvac-papaya ha demostrado ser inmunogénica y protectora en modelos de conocida capacidad predictiva y es inmunogénica en cerdos, aunque aún, no ha sido evaluada en contra de la cisticercosis porcina (Fragoso *et al.*, 2017). Al respecto de la producción de biológicos basado en productos naturales, una preocupación es las dificultades de lograr una composición definida y constante de los mismos. Para resolver esta limitante, en los últimos años se ha concebido la producción de los biológicos bajo condiciones controladas en cultivos *in vitro* (Hernández *et al.*, 2010). Esto asegura y permite

definir la composición de producto biológico con precisión y certeza de reproducir los resultados originalmente obtenidos.

### **2.1 Cultivo *in vitro* de plantas transgénicas**

Diversas estrategias *in vitro* han sido desarrolladas con el objetivo de incrementar el contenido de metabolitos bioactivos incluyendo técnicas destinadas a introducir, multiplicar, regenerar material vegetal en condiciones controladas. Esto se puede llevar a cabo teniendo un medio de cultivo apropiado con las características fisicoquímicas necesarias, nutrientes y reguladores de crecimiento (fitorreguladores), se pueden generar callos, desarrollar yemas o embriones. Entre los principales usos del cultivo de callos es la obtención de suspensiones celulares, aumentando la friabilidad del tejido de los callos al incrementar la concentración de auxinas o disminución de citoquininas en el medio de cultivo. Los callos se disgregan en matraces en medio de cultivo líquido, de manera uniforme, controlando variables como temperatura, pH y oxígeno disuelto, mediante agitadores orbitales; con el fin de ayudar a la disgregación de las células y poder obtener un crecimiento rápido (Weathers, et al., 2010).

### **2.2 Cultivos de callos embriogénicos**

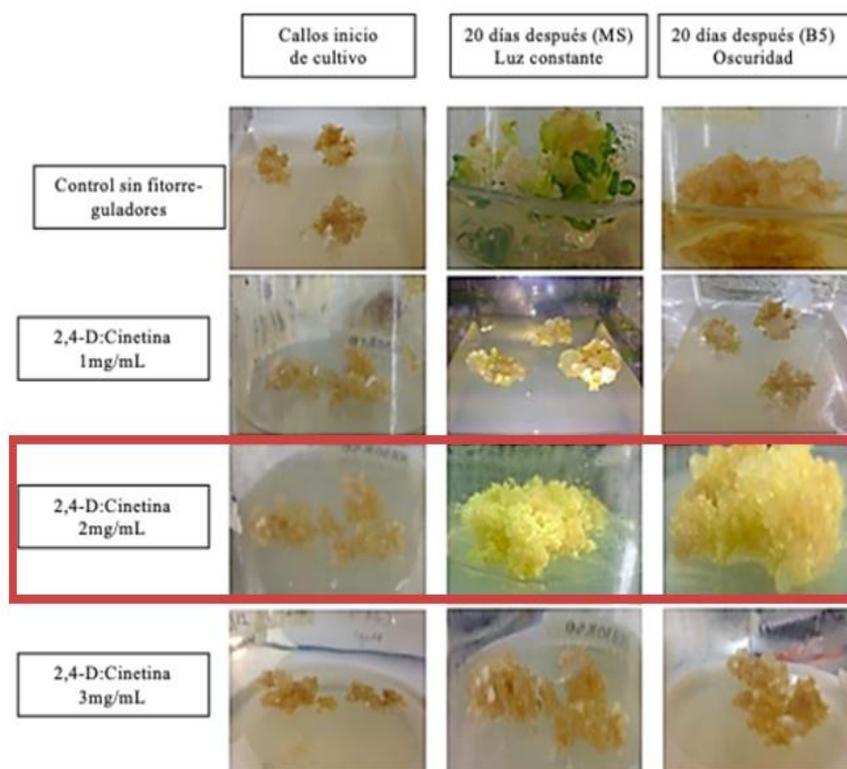
Los callos embriogénicos en estadio globular se colocaron en una placa Petri con medio M10, adicionados con 2,4-D a 10 mg/ L de medio, y sacarosa al 12%. La transformación genética se realizó con el sistema de bombardeo de alta presión de acuerdo con el protocolo establecido por Sanford *et al.*, (1991) y Tomes *et al.*, (1995) y modificado por Cabrera-Ponce *et al.*, 1995; 1997. Para la preparación de las micropartículas de tungsteno se mezclaron micropartículas resuspendidas de los plásmidos pBARGUS, y plásmido pWRG1515; y ambos contienen el gen reportero para  $\beta$ -glucuronidasa, y 10  $\mu$ g de alguna de las tres construcciones, KETc12 (línea CF-6), KETc1 (línea CF-9) y KETc7 (línea CF-23) (Hernández *et al.*, 2010),

### **2.3 Características de las células en suspensión**

Los cultivos de células en suspensión son heterogéneos, normalmente se tienen células libres y algunos agregados celulares. La proporción y tamaño, dependerá de la especie vegetal, edad del tejido en cultivo, composición del medio y condiciones de crecimiento. Al observar al microscopio, se podrán encontrar células meristemáticas y células parenquimáticas dependiendo la etapa de la cinética celular (Habeych et al., 2003).

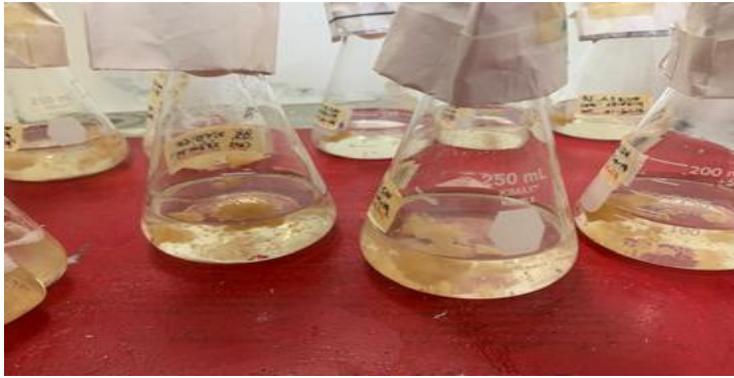
## 2.4 Adaptación y crecimiento de callos (CF) y células en suspensión (SF) de *Carica papaya* no transformados (CF-WT) y transformados (CF-23)

En el trabajo de García 2015, se optimizaron las condiciones para el establecimiento de cultivo de callos friables (CF) no transformados y transformados de la línea CF-23 de *C. papaya*, utilizando las siguientes condiciones, en un matraz Erlenmeyer se colocó: Medio Gamborg (B5), fitorreguladores 2,4D:cinetina(2mg/L:2mg/L), 30g de sacarosa, 3g/L polivinilpirrolidona, pH 5.7, temperatura 25°C en condiciones de oscuridad en una incubadora con agitación. **Figura 3.**



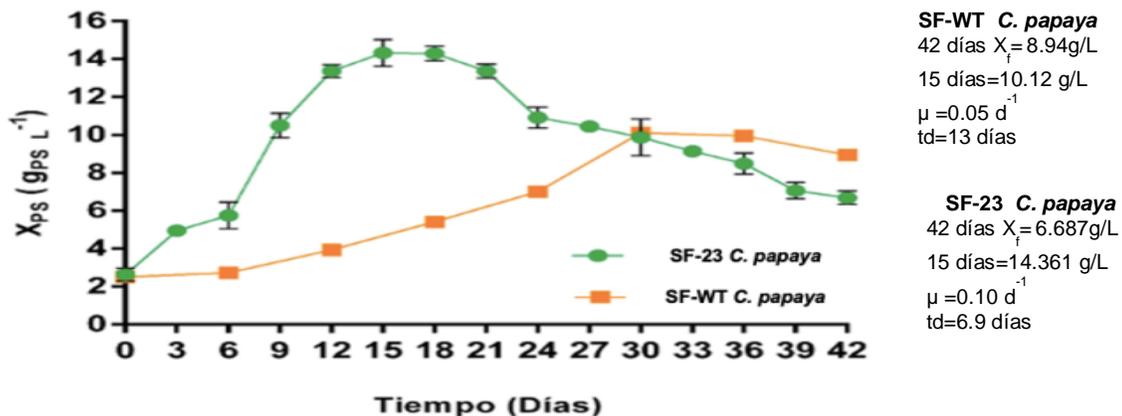
**Figura 3. Efecto de los fitorreguladores 2,4-D y cinetina sobre la línea CF-23 de *Carica papaya*, tomado de García, 2015**

En un trabajo de Pérez 2019, se obtuvieron células en suspensión a partir de callos friables, el cultivo se colocó en matraces baffleados de 250ml de las líneas transformada y no transformada de *C. papaya*, utilizando las siguientes condiciones de cultivo: inóculo 6%, Medio Gamborg (B5), fitorreguladores: 2,4D, cinetina (2mg/L), temperatura 25°C condiciones de oscuridad y agitación constante a 100rpm **Figura 4.**



**Figura 4. Adaptación de células en suspensión. Efecto de los fitorreguladores 2,4-D y cinetina sobre la línea SF-23 de *Carica papaya*, tomado de Pérez, 2019**

En la investigación de Pérez 2019, se determinaron los parámetros cinéticos de los cultivos en suspensión en los que se midió: viabilidad celular, pH del medio de cultivo, consumo de azúcares totales, concentración de proteína total y cuantificación del péptido SF-23. Siendo de interés para este trabajo los resultados de la cinética de crecimiento que se muestran en la **Figura 5**.



**Figura 5. Curvas de crecimiento, cultivo de células en suspensión línea SF-23 y SF-WT *C. papaya* (Pérez, 2019)**

Estos resultados son importantes debido a que, con base a las cinéticas de crecimiento para ambas líneas, es necesario realizar los subcultivos a la mitad de la fase exponencial, para garantizar que los cultivos generados de las células de suspensión transformadas y no transformadas de *C. papaya*, se encuentran en crecimiento activo.

## 2.5 Justificación

Actualmente, no hay disponibilidad de un producto regulado de origen natural para el control de parasitosis intestinales. El desarrollo de un antiparasitario efectivo basado en extractos de suspensiones celulares provenientes de callos de papaya transformados y no transformados, representa un producto de bajo costo que podría generarse con una composición estable y definida, y presentando inocuidad para el individuo parasitado y el medio ambiente.

## 2.6 Hipótesis

El extracto soluble acuoso preparado a partir de células en suspensión de *Carica papaya* transformadas y no transformada inducirán *in vitro* e *in vivo* daño a trofozoitos de *Entamoeba histolytica* y cisticercos de *Taenia crassiceps*.

## 2.7 Objetivo General

Evaluar la eficiencia *in vitro* e *in vivo* de extractos acuosos obtenidos a partir de células cultivadas en suspensión provenientes de callos de papaya transformados y no transformados en su capacidad antiparasitaria contra un cestodo y un protozoario.

## 2.8 Objetivos Específicos

1. Realizar estudios *in vitro* que permitan evaluar la actividad antiparasitaria de extractos solubles obtenidos a partir de células cultivadas en suspensión de líneas de *Carica papaya* transformadas y no transformadas, contra los parásitos *Entamoeba histolytica*, y *Taenia crassiceps*.
2. Realizar estudios *in vitro* e *in vivo* para evaluar la capacidad antiparasitaria de extractos acuosos obtenidos a partir de células en suspensión transformadas y no transformados de *Carica papaya*.
3. Comparar la eficiencia de las líneas de células en suspensión de *Carica papaya* contra antiparasitarios comerciales.

### **3. Material y Métodos**

#### **3.1 Mantenimiento de callos y células en suspensión para la línea no transformada y transformada para la producción de biomasa de *C. papaya***

Se realizaron cultivos de células en suspensión a partir de subcultivo de callos friables de *C. papaya*, siguiendo la metodología establecida por García en 2015, y descrita por Pérez en 2019.

#### **3.2 *Taenia crassiceps***

##### **3.2.1 Evaluación del efecto de cultivos de *C. papaya* sobre *Taenia crassiceps* en roedores**

Se inicio este proyecto con la evaluación de cisticercos de *Taenia crassiceps* empleando ratones hembras BALB/cAnN de 3 meses de edad, criados a partir de una colonia del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IBM) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Todos los procedimientos experimentales y de alojamiento se realizaron bajo las pautas establecidas por el Comité para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales del IBM, UNAM con número de identificación 6331.

##### **3.2.2 Parásitos**

La cepa ORF de *Taenia crassiceps* aislada por Freeman (1962), ha sido mantenida en ratones hembra BALB/cAnN intraperitoneales en serie durante 57 años. Los ratones se sacrificaron mediante anestesia con sevorano 100% (Abbot, <http://www.abbott.com>) y luego por dislocación cervical con ayuda de una pinza, se extrajeron quistes de la cavidad peritoneal con solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS) a 37°C. Los quistes de 4 mm sin gemación se seleccionaron siguiendo el procedimiento descrito previamente por Núñez en 2018. Los parásitos se lavaron tres veces con PBS 1x estéril. El último lavado se realizó con PBS 1x (100mL) más 1mL de antibiótico (penicilina-estreptomicina al 1%). después se realizaron tres lavados adicionales con medio RPMI 1640 (Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY) suplementado con 1% de penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 mg/mL) (GIBCO®, Invitrogen, Carlsbad, CA), respectivamente. Finalmente, los parásitos se pasaron a un frasco de cultivo celular y se incubaron durante dos horas a 37 °C.

### **3.2.3 Preparación del extracto soluble acuoso de callos embriogénicos y células en suspensión de *C. papaya***

La biomasa de los callos embriogénicos de las líneas transgénicas de papaya que expresan los péptidos recombinantes de (KETc12 (línea CF-6), KETc1 (línea CF-9) y KETc7 (línea CF-23)), (Hernández *et al.*, 2007) y de la línea no transformada de papaya (CF-WT),; así como también las biomásas de las líneas de células e. suspensiones de SF-23, SF-9 y SF-WT, se pulverizaron con nitrógeno líquido y se solubilizaron en PBS pH 7.4. Las suspensiones se centrifugaron a 14,000 rpm a 4 °C durante 30 minutos para eliminar los desechos insolubles. Se recolectó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteína, midiendo la concentración de proteína en A280 en un espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific Inc., EE. UU.)

### **3.2.4 Evaluación *in vitro* de cultivos celulares sobre cisticercos**

Se colocaron quince cisticercos en medio RPMI 1640 suplementado con penicilina (100 U/ml), estreptomina (100 mg/mL) de acuerdo con Núñez en 2018, que contenía los extractos de callos o de las células en suspensión de papaya 10 mg/mL en un volumen final de 2.0 mL por pozo. Posteriormente, las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> en placas de microtitulación de 24 pozos de fondo plano (Costar, Cambridge, MA, EE. UU.). Se añadió medio RPMI a los cultivos como control. Después de 96 horas de cultivo, se determinó la motilidad y la viabilidad. Todas las muestras fueron evaluadas por duplicado, triplicado y quintuplicados.

### **3.2.5 Motilidad y viabilidad**

Después de 96 horas de cultivo, se determinó la motilidad de los cisticercos observando aproximadamente tres minutos cada uno de los pozos bajo un microscopio estereoscópico (Olympus). La motilidad se registró por la capacidad del parásito que tiene de extenderse y retraerse, y produce una forma deslizante para moverse.

El efecto de los tratamientos sobre los cisticercos se evaluó en función de la administración de un colorante vital. Los parásitos se incubaron con azul de tripán al 0.2% (Thermo Fisher Scientific Inc. USA) a temperatura ambiente durante diez minutos. Posteriormente, se lavaron tres veces con 2,0 ml de PBS 1x y se observaron con un microscopio estereoscópico (Olympus).

En un parásito viable el Azul Tripán no se fija a la membrana, sin embargo, en un cisticercos muerto atraviesa el tegumento y se muestra como un color azul distintivo como se indica en Nuñez, 2018.

### 3.2.6 Evaluación *in vitro* del efecto cisticida de extractos con solventes orgánicos sobre cisticercos de *T. crassiceps*

Se obtuvo biomasa en peso seco de SF-WT (591.2 mg), se disolvió en 200 mL de agua desionizada en agitación constante por una hora. La disolución se filtró y el filtrado se extrajo con n-hexano (3 x 25 mL), y acetato de etilo (3 x 25 mL) de manera secuencial. Cada fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida a una temperatura máxima de 40 °C de acuerdo con el procedimiento descrito por Njanpa et al., 2021.

### 3.2.7 Preparación de los extractos orgánicos con cisticercos de *T. crassiceps*

Cada uno de las muestras obtenidas de las líneas celulares, se centrifugaron con PBS 1x, pH 7.4, durante 30 minutos, se obtuvo el sobrenadante, se prepararon diferentes concentraciones de cada extracto como se muestra en la Tabla 2, para realizar la evaluación *in vitro* por duplicado de cada uno de los extractos, y se realizó la evaluación del efecto cisticida descrita anteriormente por Núñez en 2018, monitoreando cada 24 horas.

El peso final de los extractos orgánicos obtenido fue:

- hexano 0.3mg/mL
- acetato de etilo 2.7mg/mL

**Tabla 2.** Preparación de extractos orgánicos sobre cisticercos de *T. crassiceps*

Extractos orgánicos	Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
	50
n-hexano	100
	50
acetato de etilo	100
	200
	400
Control PBS 1x pH 7.4	-----
Control Auranofin 10 $\mu\text{M}$	-----

### **3.3 Evaluación *in vivo* de *Taenia crassiceps***

#### **3.3.1 Animales para el mantenimiento de los cisticercos**

Los cisticercos de *T. crassiceps* (cepa ORF) se obtuvieron de ratones hembra BALB/cAnN infectados experimentalmente. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical; los cisticercos se extrajeron de la cavidad peritoneal y se lavaron con buffer de fosfato salino (PBS) pH 7.4.

Se mantuvo un grupo de cinco ratones los cuales fueron infectados con 15 cisticercos de *T. crassiceps* de 2mm sin gemación en solución de PBS. Se administraron con una jeringa de insulina vía intraperitoneal.

#### **3.3.2 Animales para tratamiento**

Se realizaron diferentes ensayos para establecer el diseño más adecuado para lograr los objetivos del estudio. Finalmente, al día uno se realizó la infección con cisticercos de *T. crassiceps* a ratones hembras BALB/cAnN, y al día quince posterior a la infección se administraron 200µL vía oral de los extractos solubles de SF-WT y SF-23 y de antiparasitarios comerciales a diferentes concentraciones y durante diez días consecutivos. Al onceavo día, se hizo el sacrificio de todos los ratones, se obtuvieron de la cavidad peritoneal los cisticercos y se observaron al microscopio estereoscópico. Los ratones se dividieron en grupos experimentales con grupos control y grupos tratados con los extractos solubles SF-WT y SF-23.

### **3.4 *Entamoeba histolytica***

#### **3.4.1 Cultivos de *E. histolytica***

Siguiendo el procedimiento descrito previamente por Díaz en 2019, los cultivos de *E. histolytica*: trofozoítos IMSS se mantuvieron en TYI-S-33 medio suplementado con suero 15% bovino adulto (Microlab) y 3% de vitamina (Sigma-Aldrich), en condiciones anaerobias a 37°C durante 72 horas. La virulencia de los trofozoítos se mantuvo a través de sucesivos pasajes al hígado de hámster, seguido de la recuperación de los parásitos de los abscesos hepáticos amebianos inducidos (Martínez et al., 2020).

### 3.4.2 Ensayos *in vitro*

Los trofozoítos se recolectaron de los cultivos después de 72 horas, como se mencionó por Diaz en 2019, y se sembraron en placas de cultivo de 96 pozos a  $2 \times 10^4$  trofozoítos en 200  $\mu$ L que contenían el medio TYI-S-33 fresco, mas el extracto soluble de las suspensiones de SF-23 y SF-WT. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C y se determinó la viabilidad usando bromuro de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazolio (MTT). Se agregaron 80  $\mu$ L de MTT y los extractos solubles de *C. papaya* a diferentes concentraciones (1, 2.5, 5, 7.5 y 10mg/mL) a cada pozo y las placas se incubaron durante 1hr a 37°C en la oscuridad. Posteriormente, las placas se centrifugaron a 1400 rpm durante 5 min y se retiró el sobrenadante para conservar un volumen de 100  $\mu$ L por pozo.

A cada pozo se le agregaron 100  $\mu$ L de dodecilsulfato de sodio a 60°C (15% SDS, 0.01N HCl), se homogeneizó para disolver los cristales que se formaron. Posteriormente, se midió la absorbancia a 595 nm en 15 min, utilizando un lector de placas Multiskan FC (Thermo Scientific). Se calculó previamente una curva de calibración MTT utilizando densidades de ameba de entre  $1 \times 10^3$  y  $1 \times 10^5$  parásitos/pozo. Se utilizaron trofozoítos muertos mediante tratamiento con 0.1, 1, 5, 10 o 15% de dimetilsulfóxido (DMSO) para evaluar la sensibilidad del ensayo para determinar la muerte celular. La linealidad del ensayo se demostró después de cinco repeticiones ( $r = 0.98$ ). Los experimentos se realizaron en dos ensayos independientes, cada uno por triplicado.

### 3.4.3 Protocolo de infección con parásitos y absceso hepático amebiano en hámsteres

Se mantuvieron hámsters dorados (*Mesocricetus auratus*) hembras y machos de seis semanas de edad con agua y comida *ad libitum*. Usando protocolos aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Aprovechamiento de Animales de la Facultad de medicina, UNAM con número de identificación CICUAL 5427. Siguiendo el procedimiento descrito previamente por Martínez en 2020, todos los hámsters fueron infectados por vena porta con trofozoítos virulentos de *E. histolytica* cepa HM-1:IMSS, anestesiados con pentobarbital sódico, realizando una cirugía en condiciones asépticas para exponer el hígado y se inyectaron directamente  $1 \times 10^6$  trofozoítos en 200  $\mu$ L de PBS, se dejan los animales en periodos de luz y oscuridad, transcurridos siete días se realiza la extracción del hígado, se macera y se coloca en medio TYI-S-33, se deja incubando a 37°C por 72 horas, transcurrido el tiempo se recuperan  $1 \times 10^6$  amebas, se cuentan con un

hematocitómetro y se revisa viabilidad con azul de Tripán, repitiendo cada 3 semanas el mismo procedimiento par tener un grado alto de virulencia.

#### **3.4.4 Ensayos *in vivo***

Con base a Martínez en 2020, se realizó la evaluación de amebiasis en hámster, las amibas estaban mantenidas en medio TYI-S-33 a 37°C, se centrifugaron a 2000rpm durante 3 minutos, después se retiró el sobrenadante y se re suspendieron en 1200µL de PBS para tener 1.000,000 en 200µL.

El peso promedio de los hámster fue aproximadamente 100gr±16, por lo que se les inyectaron 120µL de pentobarbital sódico intraperitoneal, ya dormido se coloca en una Tabla y se sujetó con hilo cáñamo, en posición decúbito dorsal, se rasuró la zona de la línea alba, se limpió con benzal.

Se hizo una incisión en la línea alba en piel con bisturí, después con las tijeras se hizo la separación de los músculos abdominales, se extrajeron todas las viseras, se buscó la vena porta y se inyectaron los 200 µL de amibas (para que se distribuyan bien las amibas en todo el hígado), poniendo un cuadro de esponja (Gelatina Esterilizada), para evitar la hemorragia.

Se volvieron a colocar todas las vísceras y se suturó el musculo con seda negra trenzada (MATSED) 4-0.En cuanto los animales se recuperaron se les administraron 400µL vía oral de los extractos solubles de SF-WT y SF-23 y el antiparasitario comercial a diferentes concentraciones durante siete días seguidos, y al octavo día se sacrificaron, se extrajeron los hígados, se pesaron y se hicieron cortes para histología.

#### **3.5 Bienestar animal**

Todos los procedimientos con animales fueron sometidos al Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAL, del IIB/UNAM), así como por el Comité de Ética en Investigación de IMSS/UNAM. Ambos comités se basan para su autorización en la Norma Oficial Mexicana de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) titulada "*Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*" clave NOM-062-ZOO-1999.

#### 4. Resultados

##### 4.1 Evaluación *in vitro* de líneas celulares de *C. papaya* sobre cisticercos de *T. crassiceps*

Para determinar la viabilidad de *T. crassiceps* durante los bioensayos *in vitro* se hicieron observaciones en diferentes tiempos de incubación: a 72, 96 y 120 horas en un cultivo control de cisticercos con medio RPMI 1640. Los cisticercos se empezaron a morir a las 96 horas, pero los controles seguían vivos, por lo que se decidió continuar la evaluación de viabilidad a las 96 horas para el resto de las evaluaciones *in vitro* como se muestra en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Evaluación de motilidad y viabilidad de *T. crassiceps* a las 72, 96 y 120 horas de cultivo

Número de cisticercos muertos/ Número de cisticercos totales						
	Motilidad			Viabilidad Azul de tripán		
	72 hrs	96 hrs	120 hrs	72 hrs	96 hrs	120 hrs
<b>Control RPMI</b>	0/15	0/15	5/15	0/15	0/15	5/15

Se observó la motilidad y la viabilidad de acuerdo al movimiento y retracción de los cisticercos y mediante la tinción con Azul tripán, respectivamente (permiten diferenciar células vivas de células muertas) como se muestra en la **Figura 6**.



**Figura 6.** Imagen de viabilidad por Azul Tripán a las 96 horas

En la **Tabla 3** se muestra la viabilidad de los cisticercos cultivados *in vitro* por diferentes tiempos. Como lo ilustra la tabla a las 120 horas de cultivo el 30% de los cisticercos están muertos sin haberse realizado ningún tratamiento

Considerando este resultado se decidió trabajar con cultivos de 96 hrs para evaluar el efecto de los tratamientos.

**Tabla 4.** Efecto del extracto acuoso de callos de papaya transformados y no transformados sobre cisticercos de *T. crassiceps* a las 96 horas

<b>Número de cisticercos muertos/ Número de cisticercos totales</b>				
<b>Tratamiento</b>	<b>Mortalidad 96 hrs</b>		<b>Viabilidad Azul de Tripán 96 hrs</b>	
	<b>CF-WT</b>	<b>CF-23</b>	<b>CF-WT</b>	<b>CF-23</b>
2.5 µg/mL	0/15	2/15	0/15	2/15
0.56 µg/mL	2/15	1/15	0/15	1/15
0.5 µg/mL	1/15	2/15	1/15	2/15
0.11 µg/mL	1/15	0/15	0/15	0/15
0.1 µg/mL	1/15	1/15	1/15	0/15
0.05 µg/mL	1/15	0/15	1/15	0/15
0.022 µg/mL	0/15	1/15	0/15	1/15
0.01 µg/mL	1/15	1/15	1/15	1/15
0.0044 µg/mL	0/15	0/15	0/15	0/15
Control	0/15	1/15	0/15	0/15

Como se observa en la Tabla 4 no se obtuvo efecto cisticida en ninguna de las concentraciones evaluadas. Por lo que se decidió utilizar un rango de concentraciones más alto como se observa en la **Tabla 5**. De cada serie se realizaron duplicados y se calculó el promedio.

**Tabla 5.** Efecto del extracto total de callos de papaya transformados y no transformados sobre cisticercos de *T. crassiceps*

Número de cisticercos muertos/ Número de cisticercos totales				
Tratamiento	Motilidad 96 hrs		Viabilidad Azul de Tripán 96 hrs	
	CF-WT	CF-23	CF-WT	CF-23
10 mg/mL	10/15	11/15	10/15	9/15
5 mg/mL	4/15	5/15	4/15	5/15
1 mg/mL	0/15	0/15	1/15	2/15
0.1 mg/mL	2/15	0/15	1/15	0/15
Control	0/15	0/15	0/15	0/15

Como se observa en la Tabla 5 y en la Figura 7 se obtuvo un alto porcentaje de cisticercos muertos que se distinguen teñidos con Azul Tripán. Considerando este resultado se continuó utilizando 10 mg/ml de los callos de papaya transformados y no transformados para evaluar su efecto cisticida. Se incluyeron células en suspensión de papaya no transformada y transformada como se muestra en la **Tabla 6**. De cada serie se realizó duplicado y se calculó el promedio.



**Figura 7.** Imagen de viabilidad de cisticercos de callos de papaya CF-WT

**Tabla 6.** Evaluación del efecto del extracto de callos y de líneas de células en suspensión de papaya transformados y no transformados, sobre cisticercos de *T. crassiceps*

Número de cisticercos muertos/ Número de cisticercos totales		
Tratamiento	Motilidad 96 hrs	Viabilidad Azul Tripán 96 hrs
10 mg/ml		
CF-WT	15/15	15/15
CF-23	12/15	13/15
CF-6	9/15	9/15
CF-9	11/15	10/15
SF-WT	14/15	15/15
SF-23	14/15	14/15
SF-9	12/15	12/15
Control	0/15	0/15

En la Tabla 6 se observa un alto número de cisticercos muertos con los CF en las líneas transformadas y no transformadas, con las SF de ambas líneas se repite el alto efecto cisticida. No se utilizó la SF-6 debido a que esta línea no se tiene establecida en células en suspensión en el laboratorio de plantas medicinales en la UAEM.

Se realizó una evaluación con la misma concentración de 10 mg/mL por quintuplicado, para observar el efecto de los callos y células en suspensión de ambas líneas, como se muestran en la **Tabla 7**. En la Figura 8 se muestran cisticercos teñidos con Azul Tripán de CF-WT.

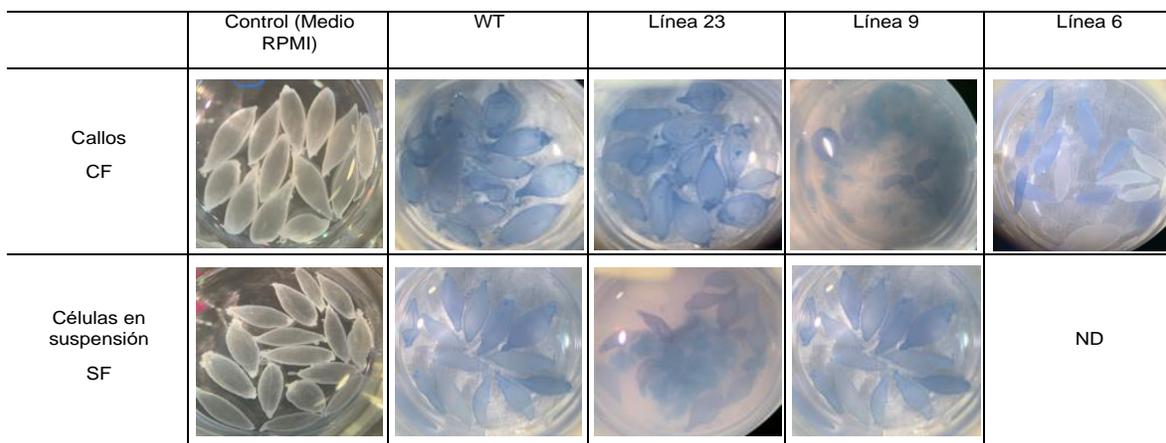


**Figura 8.** Imagen de viabilidad de cisticercos CF-23

**Tabla 7.** Evaluación del efecto del extracto de callos y células de papaya no transformados y transformados sobre cisticercos de *T. crassiceps*

Número de cisticercos muertos/ Número de cisticercos totales		
Tratamiento	Motilidad 96 hrs	Viabilidad Azul Tripán 96 hrs
10 mg/ml		
CF-WT	15/15	15/15
CF-9	14/15	14/15
CF-6	11/15	12/15
CF-23	14/15	15/15
Control	0/15	0/15
SF-WT	15/15	15/15
SF-9	15/15	15/15
SF-23	14/15	14/15
Control	0/15	0/15

Los resultados obtenidos tanto para CF y SF de las líneas WT y 23 mostraron un alto efecto cisticida, demostrando que la concentración de 10mg/mL de extracto acuoso de callos de papaya o de células en suspensión transformados y no transformados un alto porcentaje de cisticercos muertos. En la Figura 9 se muestra la viabilidad de los cisticercos teñidos con Azul Tripán tanto de los CF y SF de las líneas transformadas y no transformadas.



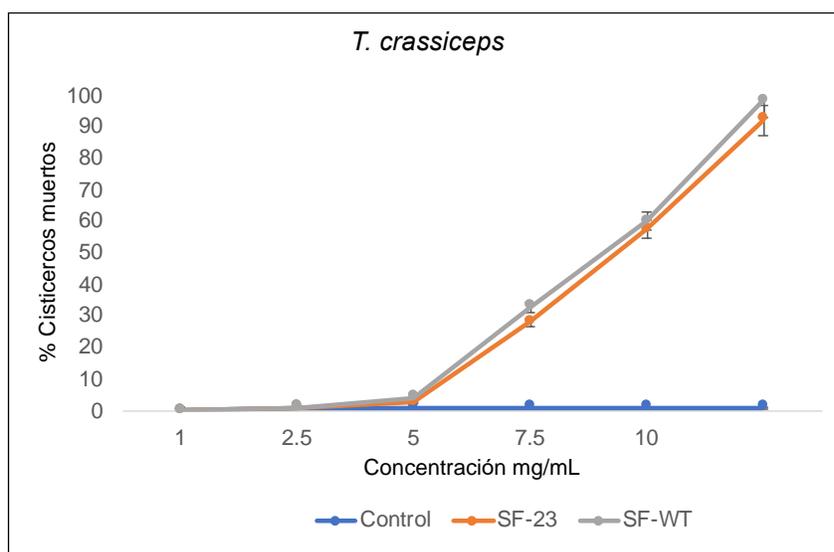
**Figura 9.** Cisticercos teñidos con Azul Tripán a una concentración de 10mg/mL de los extractos acuosos preparados a partir de callos o de células en suspensión no transformadas

**Tabla 8.** Evaluación del efecto de extractos solubles de callos y células en suspensión de papaya transformados y no transformados sobre cisticercos *in vitro*

Tratamiento	CF	SF
Control	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
WT	13.8 ± 1.79 <sup>b</sup>	14.7 ± 0.58 <sup>b</sup>
Línea 23	14.2 ± 0.84 <sup>b</sup>	13.8 ± 0.84 <sup>b</sup>
Línea 9	13.2 ± 1.48 <sup>b</sup>	13.6 ± 0.89 <sup>b</sup>
Línea 6	11.5 ± 1.14 <sup>c</sup>	ND

Se realizó la estadística de los resultados por quintuplicado (Tabla 7). Todos los resultados se distribuyeron normalmente, se analizaron mediante ANOVA y la prueba T. Las diferentes literales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los CF y SF de las líneas WT, 23 y 9. Considerando que se han optimizado los cultivos de WT y 23 se continuará trabajando con estas líneas.

En la Figura 10 se ilustra la gráfica del efecto cisticida de cantidades crecientes de las líneas WT y 23 y el grupo control, con las células en suspensión, donde se observa un efecto cisticida para ambas líneas de más del 95% a partir de 5 mg/ml.



**Figura 10.** Efecto cisticida de líneas de callos y células en suspensión de *C. papaya*

#### 4.2 Evaluación con los solventes orgánicos de los extractos SF-WT de *C.papaya* sobre cisticercos de *T. crassiceps*

Se utilizaron diferentes concentraciones de los extractos orgánicos a partir del peso obtenido de las extracciones con los diferentes solventes.

La Tabla 9, muestra el porcentaje de mortalidad con los diferentes extractos orgánicos. Se observó efecto cisticida con el extracto n-hexano que mostró alta actividad cisticida a las 72 horas destruyendo todos los cisticercos a las 96 horas de cultivo. Resultados similares se observaron con el extracto obtenido a partir de acetato de etilo.

**Tabla 9.** Porcentaje de mortalidad de cisticercos de *T. crassiceps* con diferentes extractos obtenidos a partir de células en suspensión WT de *C. papaya*

Acetato de etilo	24	48	72	96
C-	0 ±0	0 ±0	0 ±0 <sup>e</sup>	0 ±0 <sup>b</sup>
C+	0 ±0	100 ±0	100 ±0 <sup>a</sup>	100 ±0 <sup>a</sup>
50	0 ±0	0 ±0	27 ±0 <sup>d</sup>	100 ±0 <sup>a</sup>
100	0 ±0	0 ±0	73.3 ±0 <sup>c</sup>	100 ±0 <sup>a</sup>
200	0 ±0	0 ±0	86.7 ±0 <sup>b</sup>	100 ±0 <sup>a</sup>
400	0 ±0	0 ±0	100 ±0 <sup>a</sup>	100 ±0 <sup>a</sup>
n-hexano				
C-	0 ±0	0 ±0	0 ±0 <sup>b</sup>	0 ±0 <sup>b</sup>
C+	0 ±0	100 ±0	100 ±0 <sup>a</sup>	100 ±0 <sup>a</sup>
50	0 ±0	0 ±0	73.3 ±0 <sup>c</sup>	100 ±0 <sup>a</sup>
100	0 ±0	0 ±0	93.3 ±9.4 <sup>a</sup>	100 ±0 <sup>a</sup>

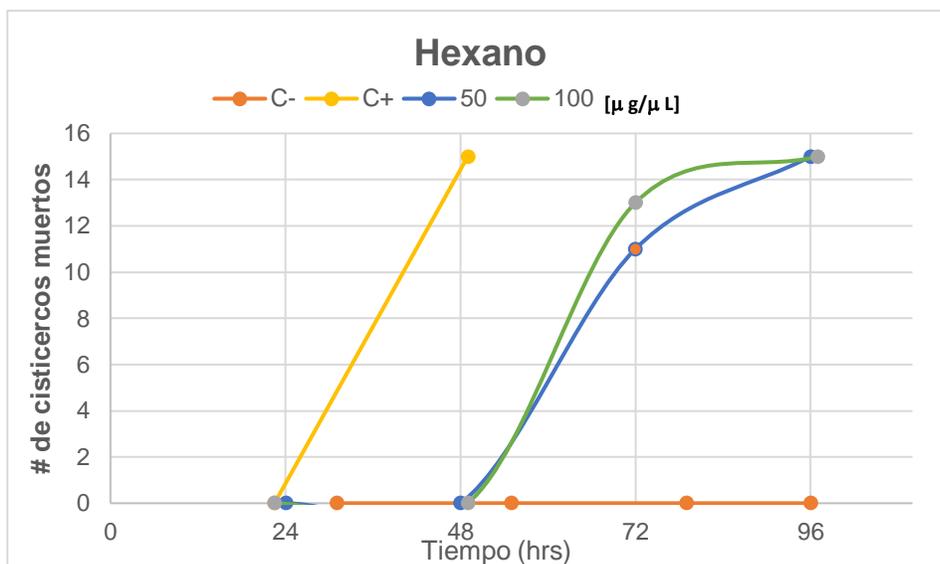
Los valores son el promedio de dos repeticiones ± DS. Diferentes letras indican que existe diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) con la prueba de Tukey entre ambos extractos.

Para el solvente de acetato de etilo se observó que a partir de la concentración de 300 y 400 µg/mL empieza un alto efecto cisticida a las 72 horas, concluyendo la mortalidad total a las 96 horas como se muestra en la grafica de la Figura 11.



**Figura 11. Evaluación del efecto cisticida de SF-WT de *C. papaya* con acetato de etilo**

En la gráfica de la Figura 12, los resultados de n-hexano mostraron que a concentración de 100µg/mL a las 72hrs mueren la mayor parte de los cisticercos y a 50µg/mL un menor número, observando que a las 96hrs todos los cisticercos de ambas concentraciones tienen 100% de mortalidad.



**Figura 12. Evaluación del efecto cisticida de SF-WT de *C. papaya* con n-hexano**

Para estos ensayos de la evaluación de los extractos orgánicos, los controles positivos se murieron a las 48hrs y los controles negativos seguían vivos hasta las 96 horas.

### 4.3 Evaluación de *E. histolytica in vitro*

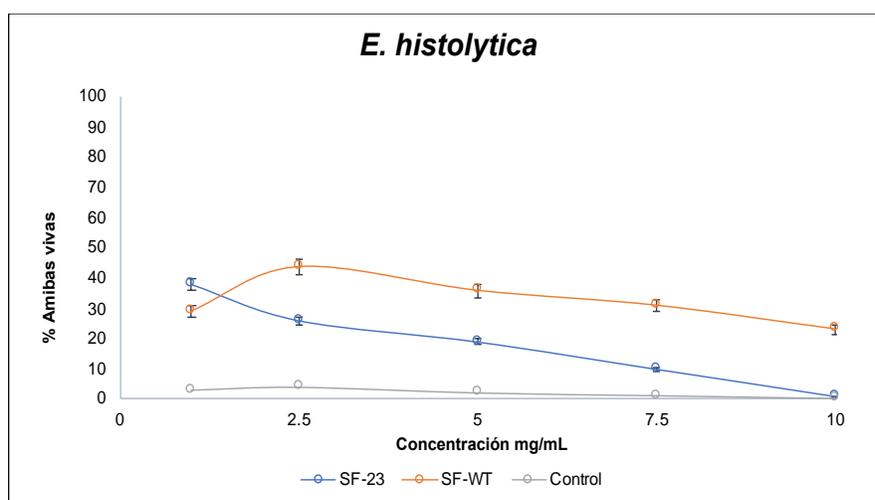
Para determinar la viabilidad de *E. histolytica in vitro* se realizaron tres ensayos por triplicado en placa de cultivo de 96 pozos que contenía: el Control vehículo con medio TYI-S-33,  $2 \times 10^4$  amibas y PBS1X y el tratamiento con el extracto soluble de SF-23 y SF-WT a 1, 2.5, 5, 7.5 y 10mg/mL, el volumen final de cada pozo fue de 200 $\mu$ L.

Los datos de MTT mostraron variaciones en la capacidad de los extractos para afectar la viabilidad de los trofozoítos de *E. histolytica*. El tratamiento a diferentes concentraciones muestra el promedio de amebas vivas. Se observa en la **Tabla 10** y en la Figura 13 conforme aumenta la concentración de los extractos solubles disminuye el número de amibas vivas. El extracto SF-23 tiene mayor efecto amebicida que el extracto de SF-WT.

**Tabla 10.** Evaluación de amebas vivas en extractos solubles de células en suspensión de *C. papaya*

Tratamiento	1 mg/mL	2.5 mg/mL	5 mg/mL	7.5 mg/mL	10 mg/mL
PBS	0.9725 $\pm$ 0.007 <sup>a</sup>	0.9813 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.9633 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.9865 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	1.003 $\pm$ 0.025 <sup>a</sup>
SF-WT	0.6121 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	0.5421 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	0.4600 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	0.3218 $\pm$ 0.3 <sup>d</sup>	0.2333 $\pm$ 0.2 <sup>d</sup>
SF-23	0.3796 $\pm$ 0.46 <sup>c</sup>	0.2786 $\pm$ 0.12 <sup>e</sup>	0.1866 $\pm$ 0.23 <sup>d</sup>	0.1283 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.0133 $\pm$ 0.005 <sup>e</sup>

Los valores son el promedio de tres repeticiones  $\pm$  DS. Promedio de amebas vivas. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) con la Prueba Tukey.



**Figura 13.** Efecto amebicida de líneas de células en suspensión de *C. papaya*

#### 4.4 Evaluación del efecto in vivo de líneas de células en suspensión de *C. papaya* sobre cisticercos de *T. crassiceps*

Con base en los resultados de la evaluación *in vitro* de *T. crassiceps* se inició evaluando concentraciones de extractos solubles de SF-23 y SF-WT a 5 y 10mg/mL, utilizando como grupos controles PBS (negativo) y Albendazol 50mg/kg (positivo) con base a lo establecido por Palomares et al., 2020.

Se infectaron al día cero con cisticercos de *T. crassiceps* y quince días posteriores a la infección se administraron los diferentes tratamientos durante diez días seguidos a los grupos de ratones, utilizando n= 7 ratones por grupo, al onceavo día se sacrificaron y se observó el número de cisticercos obtenidos de cada ratón reportando el número de cisticercos gemantes y calcificados, como se muestran en las Tablas 11-14.

**Tabla 11.** Efecto *in vivo* de extractos solubles de SF-23 y SF-WT de *C. papaya* en concentraciones de 5 y 10mg/mL

Tratamiento	No. cisticercos	No. Cisticercos gemantes	No. Cisticercos calcificados
PBS	31.33 ± 12.50 <sup>a</sup>	4.67 ± 2.08 <sup>b</sup>	2.00 ± 1.00 <sup>c</sup>
Albendazol	35.00 ± 9.90 <sup>a</sup>	3.50 ± 2.12 <sup>b</sup>	2.50 ± 0.71 <sup>c</sup>
Extracto soluble SF-23 5mg/mL	42.33 ± 22.19 <sup>a</sup>	6.00 ± 2.00 <sup>b</sup>	1.67 ± 0.58 <sup>d</sup>
Extracto soluble SF-WT 5mg/mL	23.00 ± 4.24 <sup>a</sup>	5.50 ± 2.12 <sup>b</sup>	1.50 ± 0.71 <sup>c</sup>
Extracto soluble SF-23 10mg/mL	43.00 ± 29.31 <sup>a</sup>	4.20 ± 3.90 <sup>b</sup>	1.20 ± 1.30 <sup>d</sup>
Extracto soluble SF-WT 10mg/mL	27.00 ± 9.90 <sup>a</sup>	4.00 ± 1.41 <sup>b</sup>	4.00 ± 4.24 <sup>b,c</sup>

Los valores son el promedio de 7 ratones ± DS. Evaluación por duplicado. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) con base a la Prueba de Tukey.

Como se observa en la Tabla 11 no hubo efecto de los tratamientos con los extractos utilizados ni con la droga cisticida en las condiciones evaluadas.

**Tabla 12.** Efecto *in vivo* de extractos solubles de SF-23 y SF-WT de *C.papaya* a concentración de 10mg/mL

Tratamiento	No. cisticercos	No. Cisticercos gemantes	No. Cisticercos calcificados
PBS	21.00 ± 14.07 <sup>a</sup>	5.8 ± 0.83 <sup>b</sup>	1.4 ± 0.55 <sup>c</sup>
Albendazol	13.57 ± 13.86 <sup>a</sup>	8.25 ± 5.9 <sup>b</sup>	1 <sup>c</sup>
Extracto soluble SF-23 10mg/mL	24.18 ± 16.90 <sup>a</sup>	2.4 ± 1.14 <sup>b</sup>	3.6 ± 0.55 <sup>c,d</sup>
Extracto soluble SF-WT 10mg/mL	16.85 ± 12.96 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.84 <sup>c</sup>	2.2 ± 1.6 <sup>b,c</sup>

Los valores son el promedio de 7 ratones ± DS. Evaluación por duplicado. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) con base a la Prueba de Tukey.

Los resultados que se muestran en las Tabla 11 y 12 indican que SF-23 y WT en el esquema utilizado no reducen significativamente el número de cisticercos esperado, las formas gemantes ni los calcificados. Considerando la similitud de los resultados obtenidos utilizando SF-23 y SF-WT se decidió continuar con SF-WT considerando la disponibilidad de material y el interés de utilizar la WT como cisticida. Adicionalmente se agregó un grupo combinando el albendazol con el extracto SF-WT, para evaluar si esta combinación muestra un efecto sinérgico.

Tratamiento	No. Cisticercos	No. Cisticercos gemantes	No. Cisticercos calcificados
PBS	160.3±33.5 <sup>a</sup>	24.0±5.7 <sup>a</sup>	1.1±1.2 <sup>a</sup>
Albendazol	86.9±16.4 <sup>b</sup>	2.0±3.6 <sup>b</sup>	7.4±1.7 <sup>b</sup>
Niclosamide 500mg	101.1±18.4 <sup>b</sup>	9.7±4.3 <sup>b,c</sup>	8.6±6.6 <sup>b</sup>
Ivermectina 2mg	124.6±28.6 <sup>b,c</sup>	11±5.9 <sup>b,c</sup>	6.3±3.7 <sup>a</sup>
CS-WT 2mg+CS-23 2µg	103.9±17.9 <sup>b</sup>	7.1±2.9 <sup>b</sup>	8±1.8 <sup>b</sup>

**Tabla 13.** Efecto *in vivo* de extractos solubles de SF-23 y SF-WT de *C.papaya* contra antiparasitarios comerciales

Los valores son el promedio de  $n=7 \pm$  DS. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) con base a la Prueba de Tukey.

En este experimento se modificó la dosis de extractos solubles, utilizando por ratón 2 mg de extracto obtenido de células en suspensión WT (el doble de cantidad de proteína que en los experimentos anteriores) y 2 µg obtenidos a partir de la clona 23 que incluye un antígeno de cisticercos. Las dosis de los extractos solubles que se administraron para esta evaluación fueron con base a lo reportado por Guzmán et al., 2023.

Los resultados obtenidos señalan que la CS-WT y la CS-23 combinada en 2 mg por ratón (20 mg/ml, 100 µl por ratón) redujo significativamente la cantidad de parásitos esperado y modificó cisticercos gemantes y calcificados.

#### 4.5 Evaluación *in vivo* de líneas celulares de cultivos en suspensión de *C. papaya* contra *Entamoeba histolytica*

Los resultados de la evaluación de los hígados de los hámsters posteriores al tratamiento, muestran un aumento de tamaño, y aparición de abscesos hepáticos. En la **Tabla 14** se empezó evaluando solo el grupo de los extractos solubles de SF-WT a diferentes concentraciones y en la **Tabla 15** se evaluaron los extractos solubles de la SF-23.

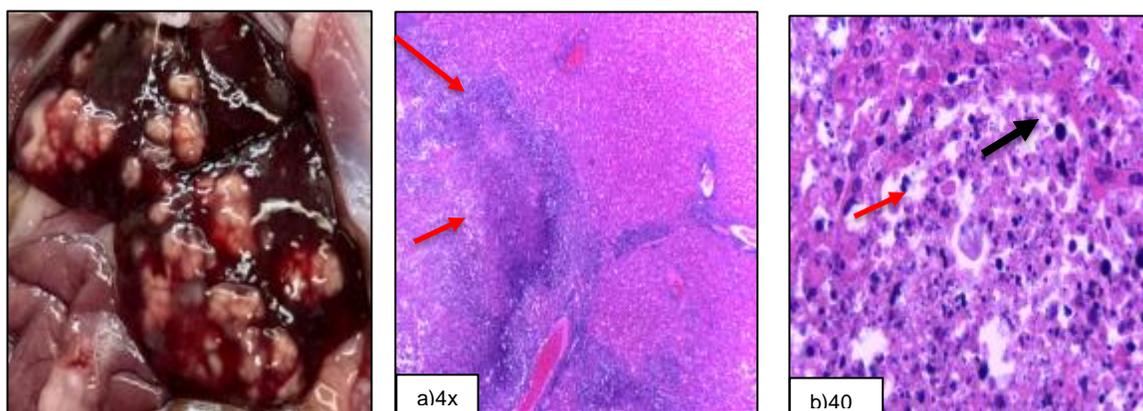
Se muestran los pesos de cada hígado, así como el promedio de cada grupo, se realizaron cortes histológicos del hígado y se tiñeron con colorante hematoxilina y eosina (HyE).

**Tabla 14.** Efecto *in vivo* de extracto soluble de SF-WT de *C.papaya*

Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
PBS	MTZ	SF-WT 10 mg	SF-WT 20 mg	SF-WT 10mg + MTZ	SF-WT 20mg + MTZ
10,11,9,10 <b>10±0.8</b>	6,6,7,6 <b>6±0.5</b>	6,6,8,7,6 <b>7±0.9</b>	6,7,7,7,6 <b>7±0.5</b>	7,7,7,6,6 <b>7±0.5</b>	8,6,6,6,7 <b>7±0.9</b>

En las siguientes figuras se muestran las imágenes de cada grupo que fueron obtenidas al tratar los hígados de hámster con extracto soluble de la línea SW-WT de *C.papaya*

**Figura14. Grupo control con PBS**



En el Grupo 1. Se observa hepatomegalia con el hígado con abscesos amebianos distribuidos en todos los lóbulos macroscópicamente detectable que afectan más del 70% del órgano.

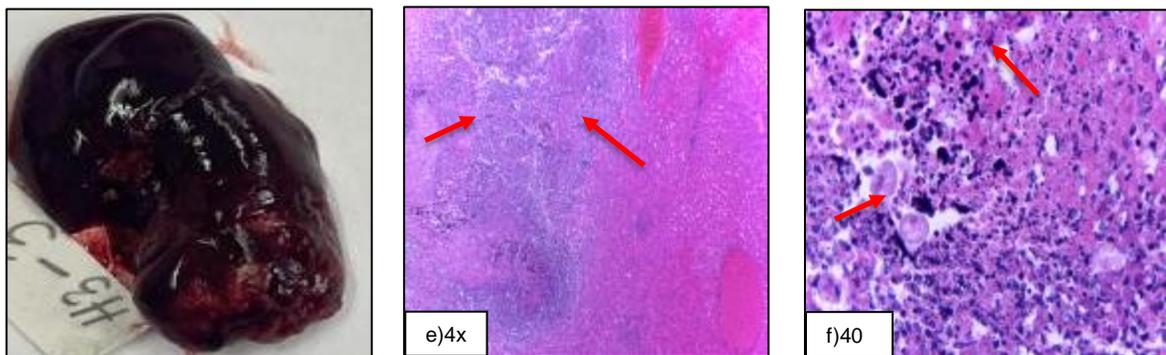
Microscópicamente. a) El tejido presenta un proceso inflamatorio y tejido necrótico y b) presencia de diversos trofozoítos.

**Figura15. Grupo control con Metronidazol**



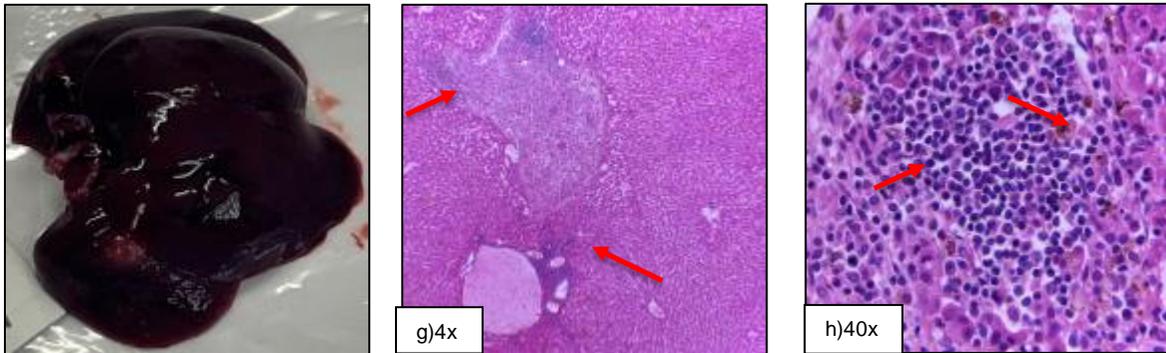
En el Grupo 2. Macroscópicamente el hígado presenta pocos abscesos amebianos en la superficie que afectan menos del 5% del órgano, así como hepatomegalia y congestión. Microscópicamente. c) Tejido normal con un procesos inflamatorios aislados y presencia de tejido necrótico, d) Presencia de trofozoítos y células inflamatorias.

**Figura16. Grupo SF-WT 10 mg**



Grupo 3. Se observa el hígado macroscópicamente con abscesos amebianos con el 5% en su superficie afectada distribuidos en todos los lóbulos y hepatomegalia y congestión. Microscópicamente. e) Corte histológico normal en dónde se observan 3 focos inflamatorios y tejido necrótico y f) Se observan diversos trofozoítos, así como células inflamatorias.

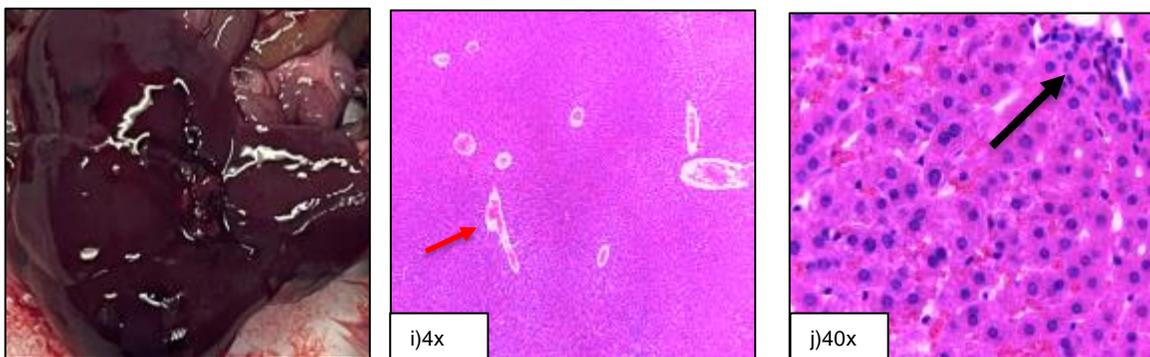
**Figura17. Grupo SF-WT 20 mg**



Grupo 4. Hígado normal con hepatomegalia y congestión, con bordes redondeados macroscópicamente.

Microscópicamente. g) Ligera aumento de tamaño y presencia de material rosáceo en las venas centrales y h) Acumulo de células inflamatorias con la presencia de trofozoitos y poco material necrotico.

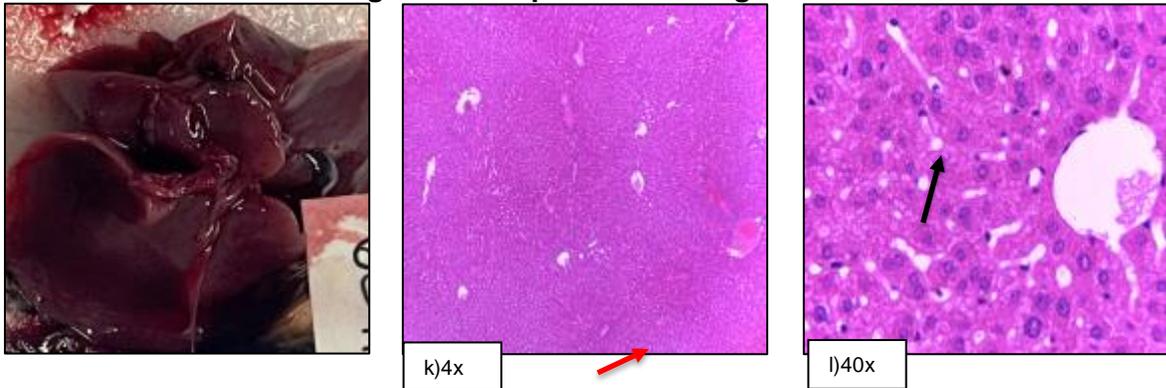
**Figura18. Grupo SF-WT 10mg + MTZ**



Grupo 5. Cavity abdominal del hámster donde se observa asas intestinales y el hígado con hepatomegalia y congestión.

Microscópicamente. i) Hígado normal con presencia de vasos dilatados y llenos de glóbulos rojos y j) Se observa ligera infiltración de células inflamatorias.

**Figura 19. Grupo SF-WT 20mg + MTZ**



Grupo 6. Se observa el hígado macroscópicamente normal.

Microscópicamente. k) Ligera congestión y l) Se observan células normales.

**Tabla 15.** Efecto *in vivo* de extracto soluble de SF-23 de *C.papaya*

Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
PBS	MTZ	SF-23 10 mg	SF-23 20 mg	c
16,16,8,13 <b>13±3.8</b>	4,9,8,4,8 <b>7±2.4</b>	13,9,8,9,10 <b>10±1.9</b>	9,10,8,8,6 <b>8±1.5</b>	6,6,7,6,6 <b>6±0.4</b>

En las siguientes figuras de muestra el efecto en cada grupo de hígados de hámster tratados con la línea SF-23 de *C. papaya*

**Figura 20. Grupo control PBS**



En el Grupo 1. Se observa el hígado macroscópicamente con abscesos amebianos en todos los lóbulos, afectando gran parte del órgano y con hepatomegalia.

Microscópicamente. a) El tejido presenta un severo proceso inflamatorio b) presencia de trofozoítos.

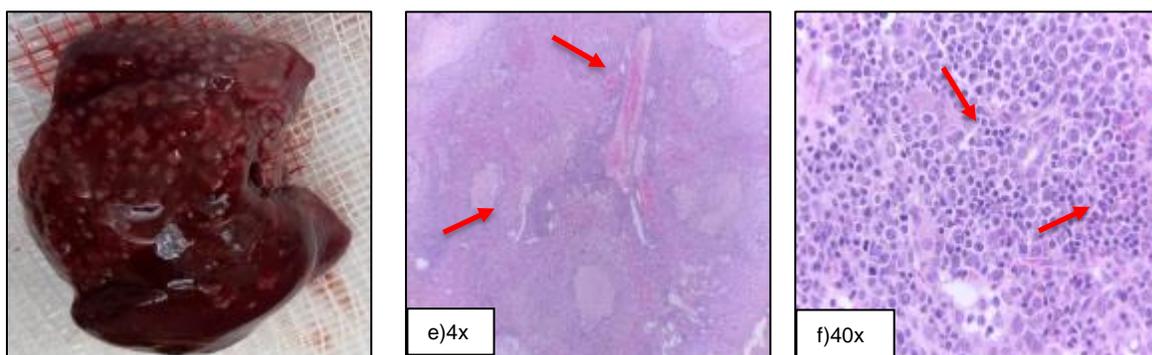
**Figura 21. Grupo control Metronidazol**



En el Grupo 2. Macroscópicamente el hígado se observa con muy pocos abscesos amebianos.

Microscópicamente. c) Tejido normal con pocas zonas inflamatorias, d) Presencia de pocos trofozoítos.

**Figura 22. Grupo SF-23 10 mg**



Grupo 3. Se observa el hígado macroscópicamente con abscesos amebianos distribuidos en todos los lóbulos y hepatomegalia.

Microscópicamente. e) Corte histológico normal en dónde se observa proceso inflamatorio y tejido necrótico y f) Se observan varios trofozoítos y células inflamatorias.

**Figura 23. Grupo SF-23 20 mg**



Grupo 4. Hígado con hepatomegalia y bastantes abscesos en gran parte de los lóbulos. Microscópicamente. g) Se observa proceso inflamatorio en casi todas las zonas del hígado h) Presencia de células inflamatorias con la presencia de trofozoitos.

**Figura 24. Grupo Figura 22. Grupo SF-23 10 mg**



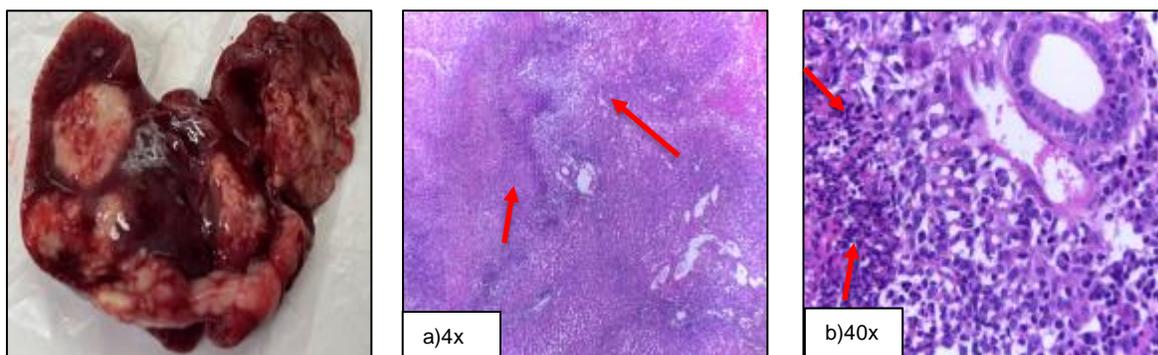
Grupo 5. Se observa el hígado con pocos abscesos amebianos y sin congestión. Microscópicamente. i) Hígado normal, se observa una ligera área inflamada y j) Se observa ligera infiltración de células inflamatorias.

Con base a los resultados anteriores de las **Tablas 14 y 15** se decidió hacer una última evaluación probando nuevamente el extracto soluble SF-WT que fue con el que se obtuvieron mejores resultados.

**Tabla 16.** Efecto *in vivo* de extractos solubles de SF-WT y SF-23 de *C.papaya*

Grupo I	Grupo II	Grupo III
PBS	MTZ	SF-WT 10 mg/mL
10,12,13,12 12±1.3	5,7,7,9,6 7±1.5	8,7,7,9,7 8±0.9

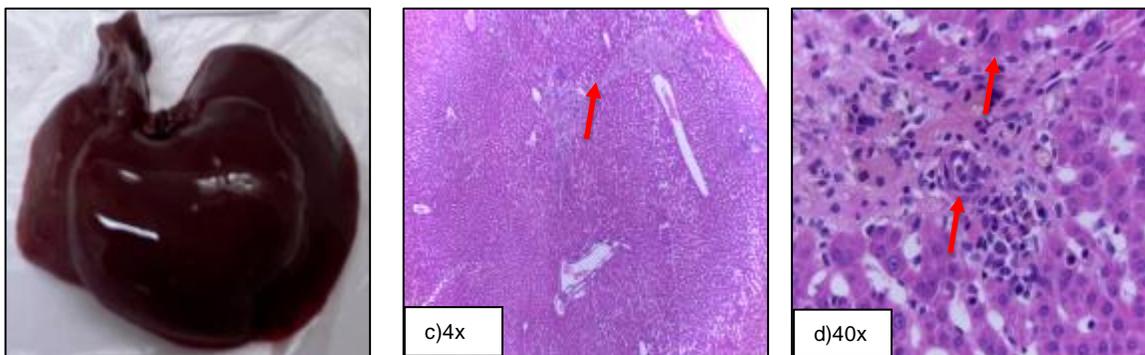
**Figura 25. Grupo control PBS**



En el Grupo 1. Se observa el hígado con abscesos amebianos en todos los lóbulos, y hepatomegalia.

Microscópicamente. a) El tejido presenta un proceso inflamatorio y tejido necrótico y b) presencia de trofozoítos.

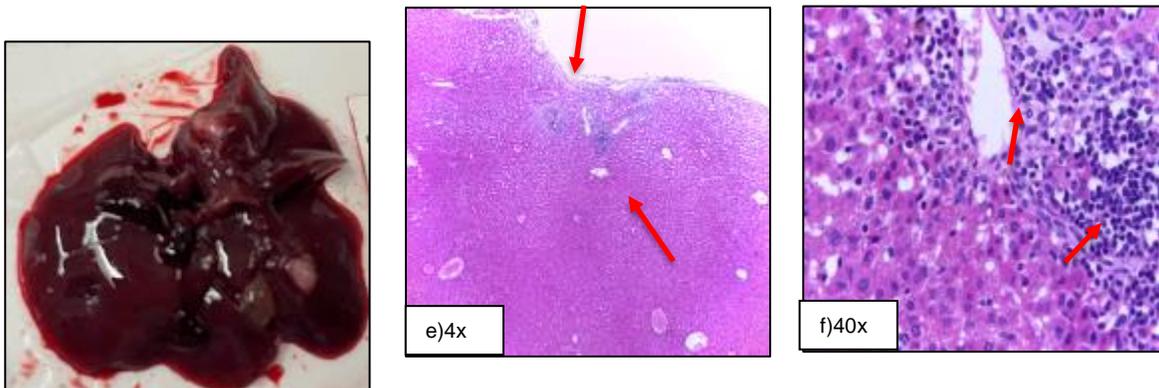
**Figura 26. Grupo control con Metronidazol**



En el Grupo 2. Se observa macroscópicamente el hígado con pocos abscesos amebianos en todos los lóbulos, hepatomegalia y congestión.

Microscópicamente. c) Tejido con procesos inflamatorio ligero y poco tejido necrótico, d) Presencia de trofozoítos y células inflamatorias.

**Figura 22. Grupo SF-WT 10 mg/mL**



Grupo 3. Se observan abscesos amebianos distribuidos en todos los lóbulos, hepatomegalia y congestión.

Microscópicamente. e) Se observa poco proceso inflamatorios y f) Se observan diversos trofozoítos, así como células inflamatorias.

Por lo tanto, el mejor efecto lo presenta el extracto soluble de SF-WT disminuyendo los abscesos amebianos y la hepatomegalia.

## 5. Discusión

Se ha reportado que los frutos de la *C. papaya* tienen propiedades antiparasitarias. Estas propiedades anti-parasitarias se han reportado especialmente contra antihelminfos derivada de sus enzimas proteolíticas en el látex de papaya como son la caricaína, quimopapaina, papaína, y glicil endopéptidasa (Satrija, *et al.* 1995, Stepek *et al.*, 2011 y Buttle *et al.*, 2011).

Adicionalmente a lo reportado en nuestro grupo de trabajo, se encontraron evidencias de que la papaya puede dañar el nemátodo *Haemonchus contortus* (Perez, 2019), con mayor eficiencia la línea transformada con la secuencia que codifica para el péptido de *Taenia crassiceps* KETc7 que la no transformada. Se observó que la biomasa de la línea de papaya transformada de SF-23 obtenida de cultivos de 12 días en suspensión inducía un porcentaje de mortalidad de larvas L<sub>4</sub> del 44.59%, a una concentración de 1 mg/mL.

Considerando estos resultados evaluamos el efecto de extractos solubles obtenidos a partir de callos embriogénicos y de cultivos de suspensión de papaya no transformada y transformada sobre los cisticercos *in vitro*. Debido a la accesibilidad para mantener estos cisticercos *in vitro* e *in vivo* y la disponibilidad de estos se evaluó el efecto de la papaya sobre su viabilidad. Cabe señalar que esta etapa del parásito no ocurre en el intestino, pero nos permite identificar las condiciones en las que podría la forma intestinal del parásito ser susceptible a este tratamiento.

En un primer ensayo se evaluó cuanto tiempo sin ningún tratamiento podían los cisticercos con solo medio RPMI mantenerse viables. La viabilidad se evaluó midiendo la motilidad y la inclusión de Azul Tripán de los cisticercos después de la incubación a diferentes tiempos de incubación (72, 96 y 120hrs) con los extractos, observando que a las 72 y 96hrs los cisticercos tenían 100% de motilidad y viabilidad, pero a las 120hrs los cisticercos empezaban a observarse muertos. Se seleccionó entonces el tiempo de incubación de 96hrs y se continuó con la evaluación del tratamiento a diferentes concentraciones del extracto soluble de callos transformados (CF-23) y no transformados (CF-WT). Al principio

de los ensayos se trabajo con extracto soluble de callos, se realizaron ensayos con diferentes concentraciones de 0.0044 $\mu$ g/mL hasta 2.5 $\mu$ g/mL, en las cuáles no se observó efecto cisticida. Se decidió entonces evaluar los callos de papaya transformados y no transformados a mayores concentraciones: de 0.1mg/mL a 10mg/mL observando que a concentraciones de 5mg/mL y 10mg/mL empezaba a verse el efecto cisticida. Con base a estas observaciones decidimos utilizar la concentración de 10mg/mL para los siguientes ensayos con tratamientos de callos y células en suspensión de papaya transformada de la línea WT y sin transformar de la línea 23 y 9. Los resultados obtenidos indicaron que tanto los extractos obtenidos a partir de callos como de células en suspensión presentan un alto efecto cisticida sin diferencias significativas entre los no transformados y los transformados con la línea 23 y según un ANOVA con una prueba de T-student. Solo los extractos de callos de *C. papaya* transformados con CF-6 mostraron menor capacidad cisticida. Cabe señalar que esta clona no ha podido establecerse en cultivos en suspensión a la fecha.

Al respecto de las cinéticas de crecimiento de las distintas clonas, en el trabajo de Pérez en 2019, se obtuvo para la línea no transformada de SF-WT de *C. papaya* una velocidad específica de crecimiento de 0.05 d<sup>-1</sup> y el tiempo de duplicación fue de 13.01 días. Mientras que la velocidad específica de crecimiento para los cultivos para la línea transgénica de SF-23 fue de 0.10 d<sup>-1</sup> y el tiempo de duplicación fue de 6.9 días. La línea SF-WT de al día 30 alcanzó la concentración máxima de biomasa, 10.12g L<sup>-1</sup> con un rendimiento de 0.328g L<sup>-1</sup> y a los 42 días una concentración de biomasa final de 8.94g L<sup>-1</sup>. Al día 15 la línea de SF-23 de *C. papaya* alcanzo una concentración máxima de biomasa, 14.361g L<sup>-1</sup> con un rendimiento de 0.391g L<sup>-1</sup>. El descenso de esta línea fue más acelerado ya que a los 42 días de cultivo se obtuvo una concentración de biomasa final de 6.687g L<sup>-1</sup>. Se puede ver como el tiempo de duplicación y la velocidad de crecimiento es mejor para las células en suspensión de SF-23 en comparación con las SF-WT.

Para la evaluación *in vivo* de *T. crassiceps* en las concentraciones de 5 y 10mg/mL no se observa efecto cisticida, los cisticercos tanto con los extractos como los controles siguen vivos y gemantes.

Se decidió aumentar al doble la cantidad de extracto utilizado inoculando los ratones con 2 mg de proteína por ratón obtenida a partir de la línea WT adicionada de 2 $\mu$ g de proteína de la línea 23, dosis que induce protección en contra de la cisticercosis (Guzmán et al., 2023). En la evaluación *in vivo* en estas condiciones se muestra un efecto cisticida. *In vivo*, las suspensiones celulares de SF-WT y SF-23 juntas redujeron el número de cisticercos,

gemas y el porcentaje de cisticercos calcificados en un grado no diferente al albendazol y la niclosamida, mientras que la ivermectina fue menos efectiva.

En la evaluación farmacológica con los diferentes extractos orgánicos, se observa que con n-hexano a las 72hrs empieza actividad cisticida alta, concluyendo la mortalidad al 100% a las 96hrs para las dos concentraciones de 50 y 100 $\mu$ g/mL, este extracto es de polaridad intermedia. Para el acetato de etilo se observa como empieza a verse un alto efecto cisticida en las concentraciones de 200 y 400 $\mu$ g/mL, concluyendo el 100% de actividad cisticida a las 96hrs con todas las concentraciones utilizadas, 50, 100, 200 y 400 $\mu$ g/mL, este extracto es el de menor polaridad. Los controles negativos (PBS1X) a las 96 horas de los 3 tratamientos, seguían vivos y los controles negativos (Auranofin 10 $\mu$ M). Se utilizaron estos dos solventes orgánicos por ser los que más se utilizan para extracciones en plantas. Estos resultados señalan la mayor efectividad de los extractos orgánicos que acuosos para dañar *in vitro* los cisticercos y la relevancia de evaluar los componentes de estos extractos capaces de mediar este efecto cisticida

Para la evaluación *in vitro* con *E. histolytica* se observó que utilizando la técnica MTT para evaluar la viabilidad de las amebas, los extractos solubles transformados de SF-23 y no transformados SF-WT de *C. papaya*, a partir de la concentración de 5mg/mL empezaron a tener capacidad amebicida sobre los trofozoítos, teniendo mejores resultados amebicidas para ambos extractos a los 10mg/mL, al igual que en la evaluación *in vitro* de *T. crassiceps* se tiene un mayor porcentaje de mortalidad a una concentración de 10mg/mL. Con base a la prueba de Tukey se observó que si existe diferencia significativa entre los extractos de SF-23 y SF-WT, con *Entamoeba histolytica*, el extracto soluble de SF-23 tiene mayor efecto amebicida en comparación con SF-WT.

En la evaluación *in vivo* con *Entamoeba histolytica*, se probaron los extractos solubles de SF-WT, SF-23 a concentraciones de 10 y 20mg/mL y combinando ambas, partiendo de la evaluación *in vivo* de *T. crassiceps*, todos se administraron vía oral, debido a que este protozooario se encuentra principalmente en colon e hígado. Para la evaluación con SF-WT con base a las imágenes macroscópica de los órganos se observan menos abscesos amebianos a concentración de SF-WT 20mg/mL y el tratamiento combinado SF-WT 20mg/mL mas Metronidazol, seguido del tratamiento combinado SF-WT 10mg/mL mas

Metronidazol que se observan pocos abscesos en el hígado. En la evaluación con SF-23 se observó poco efecto amebicida en las concentraciones mas altas de 10 y 20mg/mL con respecto al tratamiento con SF-WT, los hígados se muestran más grandes y con mas abscesos amebianos.

Para los grupos control con Metronidazol se observan abscesos en pocos lóbulos del órgano. Respecto a los grupos control sólo con PBS se observó el hígado lleno de abscesos amebianos, y con mayor hepatomegalia con respecto a los demás grupos, un hígado de hámster en el mismo peso que los utilizados en estos experimentos oscila entre 3-4gr máximo, y ya infectado pueden pesar hasta 16gr.

Al repetir la evaluación con el extracto soluble de SF-WT se muestra nuevamente la disminución de abscesos amebianos y con base al grupo control no se observa el aumento del tamaño del hígado.

## **6. Conclusiones**

Con base a los objetivos del presente estudio se puede concluir para la evaluación *in vitro*, que ambos extractos de *C. papaya* de las suspensiones celulares transformadas y no transformadas obtuvieron más del 90% de mortalidad sobre los dos parásitos evaluados.

Para la evaluación *in vivo* el extracto soluble de SF-WT demostró tener mayor efecto cisticida y amebicida sobre ambos parásitos que el extracto soluble de SF-23.

En la evaluación de los solventes orgánicos el extracto de SF-WT presentó mayor actividad cisticida el de n-hexano obteniendo efectos cisticidas a concentraciones mucho menores que las observadas con extractos acuosos.

La SF-WT demostró tener un similar efecto cisticida y amebicida que los antiparasitarios comerciales evaluados.

## **7. Perspectivas**

1. Determinar  $D_{L50}$  y  $D_{L90}$  con los resultados obtenidos de mortalidad cisticida y amebicida con los extractos solubles SF-23 y SF-WT.

2. Procesar las muestras de extractos acuosos y orgánicos de SF-WT por HPLC para la caracterización de los componentes incluidos en los mismos.
3. Realizar la formulación del antiparasitario con las células en suspensión SF-23 y SF-WT para su comercialización.
4. Realizar escalamiento en biorreactor airlift de 2L.

## 8. Referencias Bibliográficas

1. Alparo (2005). Parasitosis, giardiasis y desnutrición. Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría, 44(3),163-173.
2. Aluja et al., (2014). Evaluación del impacto de un programa de control de la teniasis-cisticercosis (*Taenia solium*). Salud Pública de México, 56(3), 259-265.
3. Barron G. M. P., (2007). Inducción *in vitro* del ciclo de vida axénico de *Entamoeba histolytica* e inhibición de su diferenciación (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
4. Betancourt et al., (2012). Effective protection induced by three different versions of the porcine S3Pvac anticysticercosis vaccine against rabbit experimental *Taenia pisiformis* cysticercosis. Vaccine 30(17), 2760–2767.
5. Buttle et al., (2011). Oral dosing with papaya latex is an effective anthelmintic treatment for sheep infected with *Haemonchus contortus*. Parasites and Vectors, 4(36), 2-11.
6. Cabrera-Ponce, et al., (1995). Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by and efficient particle bombardment transformation methods. Plant Cell Reports, 15:1-7.
7. Cabrera-Ponce, et al., (1997). An efficient particle bombardment system for the genetic transformation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). Plant Cell Reports, 16:255-260.
8. Díaz et al., (2019). Synthetic bovine lactoferrin peptide Lfampin kills *Entamoeba histolytica* trophozoites by necrosis and resolves amoebic intracecal infection in mice. Bioscience reports, 39(1).
9. Fillot et al., (2015) Prevalencia de parásitos intestinales en niños del Área Metropolitana de Barranquilla, Colombia, Revista Cubana de Medicina Tropical. 67(3), 5-7.
10. Fragoso et al., (2017). Transgenic papaya: a useful platform for oral vaccines, Planta, 245(5),1037-1048.
11. Freeman, R.S., (1962). Estudios sobre la biología de *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). Canadian Journal of Zoology , 40 (6), 969-990.
12. García, M. D., (2015). Establecimiento del crecimiento celular de *Carica papaya* L.

- modificada genéticamente. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Morelos, Cuernavaca, Morelos.
13. Guzmán et al., (2023). In Vitro and In Vivo Cysticidal Effects of Carica Papaya Cell Suspensions. *Infection and Immunity*, e00517-22.
  14. Habeych, D., (2003). Evaluación de elicitores químicos sobre la producción de indolalcaloides en células en suspensión de *Catharanthus roseus*. Medellín. Tesis (Maestría en Biotecnología). Universidad Nacional de Colombia.
  15. Hernández et al., (2007). A new highly effective antycysticercosis vaccine expressed in transgenic papaya. *Vaccine* 25(21), 4252–4260.
  16. Hernández et al., (2010) Development of an oral anti-cysticercosis vaccine delivered in genetically modified embryogenic callus of papaya. *Transgenic Plant Journal* 4 (special issue 1), 64–70.
  17. Huerta et al., (2001) Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine* 20 (1–2), 262–266.
  18. Kaur (2017). Papaya performance under various growing conditions cv. Red Lady 786. *Agricultural research communication centre*. 37(4), 290-293.
  19. Luoga et al., (2015). Factores que afectan la eficacia antihelmíntica del látex de papaya in vivo: sexo del huésped e intensidad de la infección. *Investigación de parasitología* , 114 (7), 2535-2541.
  20. Luyando (2012). *Medicina Natural*. Recuperado 2018-06-12 de: <http://mednatura.sagradafamilia.blogspot.com/2012/07/la-papaya.html>.
  21. Manoutcharian et al., (2004). Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Veterinary. Immunology and Immunopathology*. 99(1-2),11–24.
  22. Martínez et al., (2020). Rabeprazole inhibits several functions of *Entamoeba histolytica* related with its virulence. *Parasitology Research*, 119(10), 3491-3502.
  23. Morales et al., (2008). Inexpensive anti-cysticercosis vaccine: S3Pvac expressed in heat inactivated M13 filamentous phage proves effective against naturally acquired *Taenia solium* porcine cysticercosis. *Vaccine*. 26(23), 2899–2905.
  24. Njanpa et al., (2021). Bioguided isolation of anti-leishmanial natural products from *Diospyros gracilescens* L. (*Ebenaceae*). *BMC complementary medicine and therapies*, 21(1), 1-12.
  25. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

26. Nuñez M.G., (2018) Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias de la Salud y Producción Animal. Participación de anticuerpos en la protección inducida al péptido GK-1 sobre la viabilidad de cisticercos de *Taenia crassiceps*. Tesis de Doctorado Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, Ciudad de México.
27. Palomares-Alonso, et al., (2020). Effect of dexamethasone on albendazole cysticidal activity in experimental cysticercosis by *Taenia crassiceps* in BALB/c mice: In vitro and in vivo evaluation. *Experimental parasitology*, 208, 107801.
28. Pérez R.A.L., (2019) Tesis para obtener el grado de Maestría en Biotecnología: Establecimiento de del cultivo de células en suspensión de *C. Papaya* que expresan el peptido KETc7 para la vacuna s3pvac propuesta contra la cisticercosis y hemoncosis. Centro de Investigación en Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.
29. Rangel R.L.M., (2011). Tesis para obtener título de biólogo. Estudio de la respuesta inmune generada por la coinfección *Taenia crassiceps* y *Toxolasma gondhi*. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. Los Reyes Iztacala, Estado de México.
30. Rodríguez et al., (2017). Potential economic impact assessment for cattle. parasites in Mexico, *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 8(1), 61-74.
31. Sandoval J.N., (2012). Parasitosis Intestinal en países en vías de desarrollo. *Revista Médica Honduras*. 80(3), 89-90.
32. Sanford, et al., (1991). An improvement helium-driven bioballistic device. *Techniques*, 3:3-16.
33. Satrija et al., (1995). Anthelmintic activity of papaya latex against patent *Heligmosomoides polygyrus infections* in mice. *Journal of ethnopharmacology*. 48(3), 161-164.
34. Sciutto et al., (2007). Further evaluation of the synthetic peptide vaccine S3Pvac against *Taenia solium* cysticercosis in pigs in an endemic town of Mexico. *Journal of Parasitology*. 134(Pt 1),129–33.
35. Stepek et al., (2004). Natural plant cysteine proteinases as anthelmintics? *Trends Parasitology*, 20:322-327.
36. Stepek-Buttle et al., (2007). Anthelmintic action of plant cysteine proteinases against the rodent stomach nematode, *Protospirura muricola*, in vitro and in vivo. *Parasitology*. 134(Pt 1),103-112.
37. Sumaro, Camberos (2008). *Farmacología Veterinaria*, 3ª ed, p.1000. Editorial, McGraw-Hill. Interamericana.

38. Tappe et al., (2015). Molecular identification of zoonotic tissue-invasive tapeworm larvae other than *Taenia solium* in suspected human cysticercosis cases. *Journal of Clinical Microbiology*. 54: 172-174.
39. Tomes, et al., (1995). Direct DNA transfer into intact plant cells via microprojectile bombardment. In *Plant cell, tissue and organ culture* (pp. 197-213).
40. Weathers et al., (2010). Bench to batch: advances in plant cell culture for producing useful products. *Applied Microbiology Biotechnology*, 85:1339–1351.
41. Willms, et al., (2010). *Taenia crassiceps*: *in vivo* and *in vitro* models. *Parasitology*, 137(3), 335.
42. World Health Organization. (2015). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. World Health Organization.
43. Zurabian et al., (2008). Evagination and Infectivity of *Taenia crassiceps* Cysticerci in Experimental Animals.94(1):1-6.

## 9. Anexos

**Anexo 1.** Artículo de investigación: Cynthia Guzmán, Nelly Villalobos, Anabel Ortiz Caltempa, Marisela Hernández, Guadalupe Núñez, Juan Salazar, Raúl José Bobes, Gladis Fragoso, Edda Sciutto, María Luisa Villarreal, In Vitro and In Vivo Cysticidal Effects of Carica Papaya Cell Suspensions, infection and Immunity.



## In Vitro and In Vivo Cysticidal Effects of *Carica Papaya* Cell Suspensions

Cynthia Guzmán,<sup>a,c</sup> Nelly Villalobos,<sup>b</sup> Anabel Ortiz Caltempa,<sup>a</sup> Marisela Hernández,<sup>c</sup> Guadalupe Núñez,<sup>d</sup> Juan Salazar,<sup>e</sup> Raúl José Bobes,<sup>c</sup> Gladis Fragoso,<sup>c</sup> Edda Sciutto,<sup>c</sup> María Luisa Villarreal<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Biotechnology Research Center, Autonomous University of the State of Morelos, Cuernavaca, Morelos, Mexico

<sup>b</sup>Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics, National Autonomous University of Mexico, Ciudad Universitaria, Alcaldía Coyoacán, Mexico City, Mexico

<sup>c</sup>Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

<sup>d</sup>Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics, Academic Unit No. 2, Autonomous University of Guerrero, Cuahtemoc, Guerrero, Mexico

<sup>e</sup>Research Direction, La Salle University, Mexico City, Mexico

**ABSTRACT** Parasitic diseases are a major public health problem worldwide. Plant-derived products appear to be ideal candidates from a biotechnological perspective, being sustainable and environmentally friendly. The antiparasitic properties of *Carica papaya* have been attributed to some of its components, including papain and other compounds that are concentrated in the latex and seeds. This study demonstrated *in vitro* a high and insignificantly different cysticidal activity of soluble extract that was obtained after the disruption of nontransformed wild-type (WT) cells as well as transformed papaya calluses (PC-9, PC-12, and PC-23) and papaya cell suspensions (CS-9, CS-12, and CS-23). *In vivo*, cell suspensions of CS-WT and CS-23 that had been previously lyophilized were tested with respect to their cysticidal effects, compared with those of three commercial antiparasitic drugs. CS-WT and CS-23 together reduced the number of cysticerci, the number of buds, and the percentage of calcified cysticerci in a similar extent to albendazole and niclosamide, whereas ivermectin was less effective. Mice were then orally immunized with CS-23 that expressed the anti-cysticercal KETC7 antigen (10 µg/mouse), CS-WT (10 mg/mouse), or both together to evaluate their preventive properties. CS-23 and CS-WT significantly reduced the expected parasite and increased the percentage of calcified cysticerci as well as recovery, being more effective when employed together. The results reported in this study support the feasibility of the development of an anti-cysticercosis vaccine from cells of *C. papaya* in *in vitro* cultures, as they are a source of an anthelmintic, natural, and reproducible product.

**KEYWORDS:** *Carica papaya*, *T. crassiceps*, cysticercosis, anti-parasitic, papaya cell suspensions

Parasitic diseases are among the major public health problems worldwide that generate large economic losses due to budget allocations in special programs that are focused on prevention and treatment of public and animal health effects (1).

Parasitic infections are commonly caused by helminths. *Taenia solium* is one of the helminths that most frequently and seriously affects human health. The World Health Organization (1) identified *T. solium* as being among the main causes of death from food borne diseases. This parasite affects humans and pigs. In humans, taeniasis is acquired by ingesting the parasite's larval cysts (cysticerci) in undercooked and infected pork. Taeniasis human carriers can eliminate thousands of eggs in their feces, thereby contaminating the environment when they defecate in open areas. The eggs develop into larvae when established in the central nervous system, thus causing neurocysticercosis, which is the most severe form of the disease. This zoonosis, related to poverty, is favored in

**Editor** DeBroski R. Herbert, University of Pennsylvania

**Copyright** © 2023 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Edda Sciutto, eddagunam.mx, or María Luisa Villarreal, lusav@ciqa.uam.mx.

The authors declare no conflict of interest.

**Received** 15 November 2022

**Returned for modification** 1 January 2023

**Accepted** 24 May 2023

areas where the non-adequate processing of feces still prevails and where pigs are bred without confinement and are fed on waste, including human feces. All of these conditions are found in rural areas in developing countries (2). Despite the high prevalence of this cestodiasis and its impact on human health, veterinary health, and the economy, its eradication remains a major challenge, particularly in non-developed countries where the cestodes life cycles are firmly established in their social, cultural, and economic contexts.

Because of the high cost and difficulties of experimentation in pigs, another cestode, namely, *Taenia crassiceps*, that naturally affects rodents has been extensively employed to study the relevance of immunological, sexual, genetic, endocrinological, and behavioral factors on cysticercosis with the aim of gaining knowledge regarding *T. solium* (3–6). *T. crassiceps* cysticerci are visible vesicles that can rapidly proliferate by budding and can be maintained *in vivo* and *in vitro*. *In vitro*, cysticerci can be cultured for months and reproduced by budding. *In vivo*, the parasite rapidly reproduces in the peritoneum of mice (7–10). Currently, there are many chemotherapeutic products, such as benzimidazoles, macrocyclic lactones, and imidazothiazoles, to treat many helminths, including *T. solium* (2). In addition to their environmental impacts, the indiscriminate use of these antiparasitic products resulted in the development of anthelmintic resistance (11). Thus, there is a need to develop new antiparasitic products that override drug resistance and are more gentle with the environment. Plant-derived products appear as ideal candidates from a biotechnological perspective, being sustainable and environmentally friendly. Products derived from different plants, such as bilharzia, gastrointestinal worms and helminths, ectoparasites, trichomoniasis, leishmaniasis, and trypanosomiasis, have been used for this purpose (12). Among them, papaya (*C. papaya*), which is a tropical fruit, has demonstrated different medicinal applications (13). Its antiparasitic properties have been attributed to some of its components, including papain, chymopapain, lysosome, glycol endopeptidase, cysteine proteinase, and benzyl isothiocyanate, which are compounds that are concentrated in the latex and papaya seeds (14).

In our research, we used *C. papaya* to express the three peptides of the synthetic vaccine (S3Pvac) against porcine cysticercosis. The S3Pvac vaccine consists of three peptides, namely, KETc1, KETc12, and KETc7, that synthetically and recombinantly produce a high level of protection against cysticercosis in pigs that are naturally exposed to the parasite. As mentioned above, to develop an oral vaccine, the peptides were expressed in embryogenic papaya calluses (15–17). From the transformed calluses, the respective lines of cells were established in suspension together with the wild-type (WT) (18). During these studies, extensively modified protein content was observed in the transgenic callus. Thus, the objective of the present work was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* antiparasitic and protective effects of KETc7 (CS-23) transformed and nontransformed (CS-WT) lines of *C. papaya* against *T. crassiceps* cysticercosis.

## RESULTS

**In vitro evaluation of the cysticidal effects of soluble extracts from *C. papaya* calluses (PC) and cell suspensions (CS).** Experiments were carried out to test nontransformed and transformed calluses and cell suspensions at different times to identify the more appropriate conditions under which to evaluate their cysticidal properties (data not shown) by culturing 15 cysticerci per well with 10 mg/mL of each soluble for 96 h. Table 1 shows that both PC-WT and transformed PC-23 induced a high level of cysticidal effect that was of the same magnitude as that of CS-WT and the transgenic CS-23 lines. A representative figure of the macroscopic effects of the extracts on the cysticerci is represented in (Fig. 1A), where dead cysticerci that were stained with trypan blue are observed at 96 h posttreatment. Fig. 1B shows the microscopic effect of the soluble extract CS-23, compared to that of CS-WT, to visualize the damage in the structure of dead cysticerci.

**In vitro evaluation of the cysticidal effects of extracts with organic solvents on *T. crassiceps* cysticerci.** To further evaluate possible cysticidal components of CS-WT, organic fractions using different solvents were obtained. The components in each fraction were characterized via infrared spectroscopy (IR) and identified based on their polarities. The extracts obtained from fractions A and B, namely, n-hexane and ethyl

**TABLE 1** *In vitro* effect of *C. papaya* soluble extracts on *Taenia crassiceps* cysticerci<sup>a</sup>

Treatment	No. of dead cysticerci per well	Mean $\pm$ SD of dead cysticerci	Mortality (%)
Soluble extract from papaya callus			
RPMI medium	0 <sup>a</sup>		
PC-WT	15,15,15,13,11	13.8 $\pm$ 1.78 <sup>a</sup>	92
PC-23	15,15,14,14,13	14.2 $\pm$ 0.84 <sup>a</sup>	95
PC-9	15,14,13,13,11	13.2 $\pm$ 1.48 <sup>a</sup>	88
PC-6	13,12,12,11,10	11.6 $\pm$ 1.14 <sup>a,b</sup>	77
Soluble extract from papaya cell suspension			
RPMI	0 <sup>a</sup>		
CS-WT	15,15,14,14,14	14.5 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	97
CS-23	15,15,15,15,14	14.8 $\pm$ 0.85 <sup>a</sup>	99
CS-9	15,15,14,14,14	14.4 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup>	96
CS-6	ND		ND

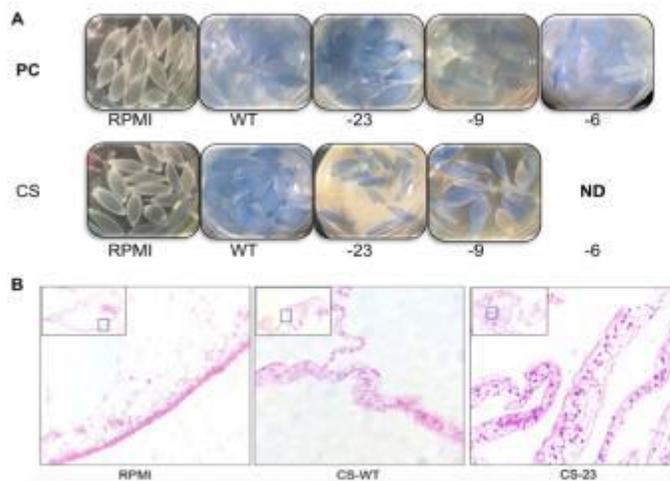
<sup>a</sup>Different letters indicate statistically significant differences with  $P \leq 0.05$ .

acetate, respectively, were made to obtain different dilutions of the aforementioned concentrations, and the *in vitro* cysticidal activity of the extracts at different concentrations was evaluated every 24 h for 4 days.

Table 2 shows the percentage of dead cysticerci with the different organic extracts. Cysticidal activity became apparent at 72 h of culture, and all of the parasites were dead at 4 days of culture with the different treatments.

A higher cysticidal effect was observed at a higher concentration using fraction A at 72 h, and all of the cysticerci reached 100% mortality at both concentrations at 96 h after culture. A lower percentage of mortality was induced by fraction B at the same concentration, compared to that induced by fraction A, revealing that the latter had a higher cysticidal capacity. The cysticerci of the positive controls that were exposed to Aurofine (10  $\mu$ M) (19) died 48 h later, whereas all of the parasites remained alive when incubated with media alone for up to 96 h.

***In vivo* evaluation of the cysticidal capacity of suspensions of CS-WT and CS-23 from *C. papaya*.** 15 days after infection, mice were treated orally with suspensions of



**FIG 1** The effect of soluble extracts on *Taenia crassiceps* cysticerci. (A) Macroscopic (5 $\times$ ) effect of papaya callus (PC) and papaya cell suspension (CS) soluble extracts upon *T. crassiceps* cultured *in vitro*. Cysticerci were stained with trypan blue dye after 96 h of culture with the different treatments. (B) Microscopic changes of cysticerci cultured with RPMI alone, CS-WT, or CS-23 soluble extracts assessed by light microscopy, HE  $\times$  40 (HE  $\times$  10) external and internal images, respectively.

**TABLE 2** *In vitro* mortality of organic fraction extracts of CS-WT on *T. crassiceps* viability<sup>a</sup>

Treatment	Time of culture (hours)			
	24	48	72	96
RPMI medium	0	0	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
Aurofine	0	100	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>
Fraction A				
50 $\mu$ g/mL	0	0	73.3 <sup>c</sup>	100 <sup>b</sup>
100 $\mu$ g/mL	0	0	93.3 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
Fraction B				
50 $\mu$ g/mL	0	0	27 <sup>d</sup>	100 <sup>a</sup>
100 $\mu$ g/mL	0	0	73.3 <sup>c</sup>	100 <sup>a</sup>
200 $\mu$ g/mL	0	0	86.7 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>
400 $\mu$ g/mL	0	0	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Mean  $\pm$  SD of the percentage of mortality of the cysticerci of two assays. Different letters indicate whether there is a statistically significant difference, based on Tukey's test.

CS-WT and CS-23 from cell-cultured *C. papaya*. To improve their effectiveness, the mice were treated each day (200  $\mu$ L) for 10 days with CS-WT (10 mg/mL) and CS-23, which expressed a cysticidal antigen. The effects were compared with those observed in mice that were treated with either saline alone (negative control) or three well-known commercial anti-cysticidal drugs (albendazole, ivermectin, and niclosamide). Their effects on the number of cysticerci, the percentage of calcified cysts, and the number of total buds were recorded. Table 3 shows a significant reduction in the number of cysticerci and buds as well as an increase in the number of calcified cysticerci that were observed in the mice that were treated with CS-WT and CS-23, albeit to an insignificant extent, compared to those observed with albendazole and niclosamide. A significantly lower effect was induced by ivermectin.

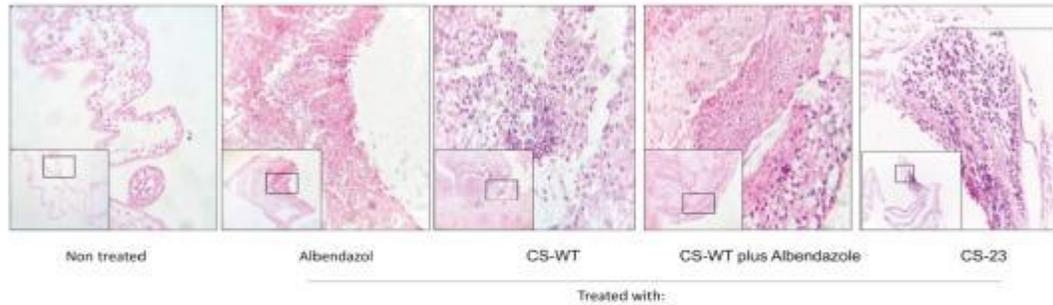
Fig. 2 shows the microscopic effect of each treatment. No structural changes were observed in the cysticerci that were recovered from the nontreated mice, whereas in those that were recovered from mice treated that were with albendazole, a thickened capsule and a severe inflammatory reaction were observed, and these were accompanied with necrosis and the infiltration of mononuclear cells. The infected mice that were treated with CS-WT or CS-23 experienced a loss of cysticercal structure, necrosis, and the infiltration of mononuclear and polymorphonuclear inflammatory cells.

**Protective effect of oral immunization with suspensions of CS-WT and CS-23 against *T. crassiceps* cysticercosis.** An experiment was carried out, immunizing mice with 200  $\mu$ L of a cell suspension of CS-WT (10 mg/mL) and/or CS-23 (10  $\mu$ g/mL) to evaluate whether the extracts of the cell's suspension exert a protective effect as an oral vaccine against cysticercosis. The CS-WT suspension was used as an excipient to formulate the anti-cysticercosis and can be administered orally in large amounts without the induction of undesirable effects. The CS-23 suspension includes the protective cysticercal antigen KETc7, and it is employed in much smaller amounts to avoid any tolerance effects. As Fig. 3 shows, oral immunization with both extracts significantly

**TABLE 3** Evaluation of the effect of CS-23 and CS-WT soluble extracts on *T. crassiceps* cysticerci<sup>a</sup>

Treatment	Cysticerci		
	Total	Budding	Calcified (%)
PBS	160.3 $\pm$ 33.5 <sup>a</sup>	24.0 $\pm$ 5.7 <sup>a</sup>	1.1 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>
Albendazole (50 mg/kg)	86.9 $\pm$ 16.4 <sup>b</sup>	2.0 $\pm$ 3.6 <sup>b</sup>	7.4 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>
Niclosamide (500 mg/mouse)	101.1 $\pm$ 18.4 <sup>b</sup>	9.7 $\pm$ 4.3 <sup>b,c</sup>	8.6 $\pm$ 6.6 <sup>b</sup>
Ivermectin (2 mg/mouse)	124.6 $\pm$ 28.6 <sup>b,c</sup>	11 $\pm$ 5.9 <sup>b,c</sup>	6.3 $\pm$ 3.7 <sup>a</sup>
CS-WT (2 mg/mouse) + CS-23 (2 $\mu$ g/mouse)	103.9 $\pm$ 17.9 <sup>b</sup>	7.1 $\pm$ 2.9 <sup>b</sup>	8 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>The values are the average of  $n = 7 \pm$  SD. Different letters indicate statistically significant differences ( $P = 0.05$ ), based on Tukey's test.

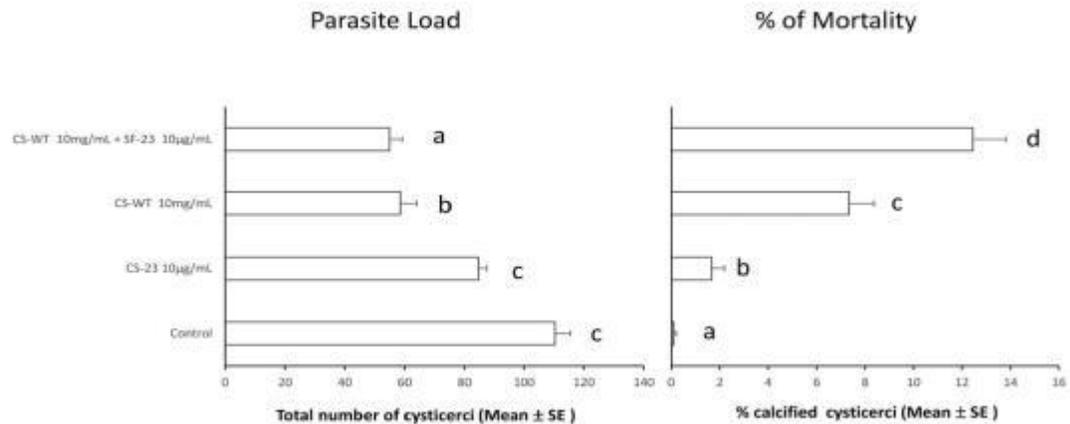


**FIG 2** Illustrative histological aspect of cysticerci that were stained with hematoxylin and eosin (HE) and were recovered from nontreated and treated mice. HE  $\times 40$  (HE  $\times 10$ ) external and internal images, respectively.

reduced the expected parasite load, although CS-WT exhibited a higher protection that was not modified when both extracts were employed together. A significant increase in the percentage of calcified cysticerci was induced via oral immunization with CS-WT and CS-23, used either individually or together.

#### DISCUSSION

An oral vaccine against porcine cysticercosis has been developed based on three transgenic clones that express three peptides from *T. crassiceps* cysticercosis. Although this vaccine has shown a high protective capacity when administered orally under experimental conditions (20, 21), its production and marketing present several challenges. For its massive production, the cultivation of calluses (PC) in a solid medium is a limitation. Therefore, its production in suspension cell cultures (CS) was optimized as previously reported (18). For its commercialization as a vaccine, the lack of interest of laboratories, because it is economically unprofitable, has been an obstacle (personal communication). Considering this limitation, we decided to evaluate the possibility of formulating the vaccine in the framework of an antiparasitic product, using nontransformed papaya as an excipient. Previous information on the anti-helminthic activity of



**FIG 3** Protection was assessed by the total number of recovered cysticerci and by the percentage of calcified cysticerci. The values are the average of  $n = 7 \pm$  SD. Different letters indicate statistically significant differences ( $P = 0.05$ ), based on Tukey's test (parasite load) and on Fisher's exact test (percentage of mortality).

papaya supports this possibility (22–24). It derives its activity from proteolytic enzymes that are present in papaya latex, such as caricain, chymopapain, papain, and glycyI endopeptidase, which eliminates a large percentage of intestinal parasites without significant side effects (23, 25–27). It has also been reported that papain, which is an enzyme that accompanies chymopapain as an enzyme component, is capable of dissolving the keratin or chitin that covers the bodies of intestinal helminths (28).

In this study, we demonstrated the *in vitro* cysticidal effect of aqueous extracts from the PC and CS of nontransformed and transformed papaya. As shown in Fig. 1, all of the extracts that were tested *in vitro* effectively induced damage to cysticerci to a similar extent. Thus, the aqueous extract of WT-papaya can be employed as an excipient for use in an antiparasitic product. It is feasible that the anti-helminthic properties of the CS papaya depend on the parasite. In this respect, we recently reported a higher efficiency of CS-23 in destroying *Haemonchus contortus* larvae *in vitro*, compared to that of CS-WT (18).

Further experiments testing organic fractions, as shown in Table 2, begin with the identification of additional antiparasitic products in the CS-WT papaya. The components that were isolated using n-hexane include the higher cysticidal activity between the organic extracts. Additional studies are required for their precise identification.

Thereafter, the anti-cysticidal properties of aqueous extracts of papaya cells were tested *in vivo* against murine *T. crassiceps* intraperitoneal cysticercosis. These studies were performed using only CS-WT and CS-23. As shown in Table 3, both treatments together reduced the number of cysticerci buds and increased the percentage of calcified cysticerci, to a similar extent to that observed with two other, different cysticidal drugs, namely, albendazol and niclosamide. Both treatments together were more effective than ivermectin. These effects could reflect a significant effect on the reproductive capacities of the parasites, which lay in components that are expressed in the extracts of papaya cell suspensions.

The *in vitro* and *in vivo* cysticidal effects of papaya add to the bibliography more antiparasitic properties of papaya. In this respect (22), studies of the stability of cysteine proteases in the papaya latex reported that the activity of these enzymes remains stable, even if kept at low temperatures, and they identified enzymatic activity in the colons of mice at 4 h after the oral administration of the extract. The cysticidal effect reported herein on parasites that were obtained from the peritoneal cavities of mice would indicate that the effects of these compounds might be occurring not only locally (intestine) but also systemically (extra intestine), possibly through immunoregulatory processes.

Considering that the transformed papaya that expressed the KETc7 immunogenic protein (PC-23) previously demonstrated a high protective capacity against murine cysticercosis (17), we tested the preventive capacity of the CS-23 suspension against murine cysticercosis after oral immunization. CS-WT was also tested at 2 mg per mouse, which was the amount that exhibited anti-parasitic activity and was used as an excipient in the vaccine formulation. Meanwhile, CS-23, which includes a cysticercal antigen, was given in a small amount (2  $\mu$ g per mouse) to avoid tolerance. We previously demonstrated the protective capacity of PC-23 in a range from 0.1 to 10  $\mu$ g per mouse (20). Thus, CS-WT was tested at 1,000 times that of CS-23. As shown in Fig. 3, CS-23 significantly reduced the expected number of cysticerci and increased the percentage of calcified parasites. These results are similar to those that were obtained by using a soluble extract of PC-23 that was subcutaneously administered (17).

A finding that merits special comment is the high effectivity of the oral immunization with the soluble extract of CS-WT to reduce the number of cysticerci and increase parasite calcification. This result indicated the immunoregulatory properties of the soluble extracts of papaya cell suspensions for the first time. This is an important finding that needs further evaluation to be employed as a useful immunomodulator in oral vaccination. Interestingly, when CS-23 was formulated with CS-WT as an excipient, the highest effect on the mortality of the established cysticerci was obtained.

Taken together, the information reported in this study strongly supports the feasibility of the production of an anti-cysticercosis vaccine in the context of an effective,

innocuous, and antiparasitic product that could also be friendly to both the environment and the recipients of the product. Additionally, oral vaccines formulated with these papaya calluses and cell suspensions could have antiparasitic effects over other intestinal parasites, such as the adult stage of *Taenia solium* and other helminths (12), which could not only impact the health of the host but also interrupt the contamination of the environment, which could affect land and water plants (29).

Finally, it is important to state that many natural products with antiparasitic activity have been reported. Among them is epazote, which demonstrated antiparasitic activity mainly in protozoa; however, if it is administered in excess or in a high concentration, it produces serious and toxic effects (30). Additionally, paico exhibited antiparasitic activity in low concentrations in the form of infusion (31), and garlic has been shown to reduce the parasite load at different concentrations and formulations (32). However, the use of these products is limited by the lack of reproducibility of their content. Thus, the use of these products is unregulated, as it is impossible to formulate them. In contrast, the papaya cell suspensions are produced in a reproducible form under controlled conditions *in vitro*, do not cause side effects in the host, and can be formulated and developed.

**Conclusions.** The soluble extracts of *C. papaya* from the lines PC-23, PC-WT, CS-23, and CS-WT, at a concentration of 10 mg/mL, exert an *in vitro* cysticidal effect on *T. crassiceps* cysticerci. More polar compounds were found in the organic extract of fraction A, and their secondary metabolites may be responsible for the high cysticidal effect. CS-23, which expressed a cysticercal antigen, can be formulated using CS-WT, as an excipient, and as an effective oral vaccine against cysticercosis. The cell suspensions of papaya cells, cultivated *in vitro*, are convenient for use in oral vaccinations, as they contain a reproducible composition. They are produced under controlled conditions that are not only effective against cysticercosis but also reduce costs, as they do not need any further purification. Additional studies are ongoing to propose and register this oral vaccine to prevent porcine cysticercosis.

## MATERIALS AND METHODS

**Obtention of extracts from calluses and cell suspensions of *C. papaya*.** The embryogenic transformants (PC-9, PC-12, and PC-23), nontransformed (PC-WT) calluses (17), and suspension cell lines (CS-9, CS-12, CS-23, and CS-WT) (18) were pulverized with liquid nitrogen, resuspended in PBS 1×, and then centrifuged at 14,000 × *g* at 4°C for 30 min. The supernatant was collected, and the protein concentration was determined via the Lowry method (33) in a NanoDrop One spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). It was then stored at -20°C until use.

**Obtention of *Taenia crassiceps* cysticerci.** The cysts ORF strain, isolated by Freeman (34), has been maintained in serial stock intraperitoneal female BALB/cAnN mice with 2 to 3 months of infection (3). Mice were infected with 15 small (2 mm) nonbudding cysticerci in 0.9 mL of 0.9% isotonic saline solution (SS) at 37°C.

***In vitro* cysticidal effect. (I) Liquid-liquid partition of crude extracts from papaya CS-WT.** The dry biomass of CS-WT (591.2 mg) was dissolved in 200 mL of deionized water with constant stirring for 1 h. The solution was filtered to obtain the crude extract. Subsequently, the solution was fractionated via liquid-liquid partitioning, according to the procedure described (35), with the following modifications: n-hexane (3 × 25 mL) was added to the aqueous layer, and stirred, and then the layers were separated. Additionally, ethyl acetate (3 × 25 mL) was added to the second layer. Each fraction was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, concentrated under reduced pressure at a maximum temperature of 40°C, and stored at -18°C until use. The fractions obtained from n-hexane and ethyl acetate were named fraction A (0.3 mg) and fraction B (2.7 mg), respectively. The fractions obtained (A and B) were centrifuged at 1,500 × *g* with PBS 1×, (pH 7.4), for 30 min. Dilutions of the fractions were made, and the following concentrations were obtained: fraction A, 50 and 100 µg; fraction B, 50, 100, 200, and 400 µg.

***In vitro* cysticidal effect of organic extracts on *T. crassiceps* cysticerci.** 15 *T. crassiceps* cysticerci (4 mm) without budding were placed in flat-bottom 24-well microtiter plates (Costar, Cambridge, MA, USA) and incubated with RPMI 1640 (GIBCO) medium supplemented with penicillin (100 U/mL), streptomycin alone (100 mg/mL, negative control), or aurofine (10 µM, positive control) (36). Cysticerci were also cultured in fractions A and B of CS-WT, incubated at 37°C with CO<sub>2</sub>, and monitored at 24, 48, 72, and 96 h.

***In vitro* evaluation of the cysticidal capacity of soluble extracts from *C. papaya* calluses and cell suspensions.** The experiments were carried out at different concentrations of calluses and cells in suspension (100 µg to 10 mg/mL) with all of the lines to determine the concentration with the greatest cysticidal effect (data not shown).

15 *T. crassiceps* small (2 mm), nonbudding cysticerci were placed, per well, into flat-bottomed 24-well microtiter plates (Costar, Cambridge, MA, USA) and incubated with 2 mL of RPMI 1640 medium supplemented

with penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 mg/mL) (36), and containing callus extracts or cell suspensions at 10 mg/mL. Cysticerci were incubated at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> in RPMI medium. The parasites were cultured with medium only (negative control). The assay was conducted in duplicate and was evaluated at 24, 48, 72, and 96 h, at which times viability was determined (36).

**In vivo cysticidal effect. (i) Mice.** BALB/cAnN female mice ( $n = 7$  per experimental group) were employed and kept in the installations of the Instituto de Investigaciones Biológicas Universidad Nacional Autónoma de México. All of the experiments were performed in accordance with the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute of Laboratory Animal Resources, National Council, Washington, DC, USA, 1996. The experimental protocol (number ID6331) was revised and approved by the Institutional Committee for the care and use of laboratory animals (ICUAL for its nomenclature in Spanish).

**In vivo evaluation of CS-WT and CS-23 from *C. papaya* on *T. crassiceps* cysticerci.** Mice that were intraperitoneally infected with 15 *T. crassiceps* cysticerci were orally treated daily for 10 consecutive days, with the suspensions starting on day 15 after infection.

The cysticidal effects of the cell suspensions of CS-WT (200  $\mu$ L of 10 mg/mL) plus CS-23 (200  $\mu$ L of 10  $\mu$ g/mL) were compared to those of saline (negative control) and three well-known anti-cysticidal drugs, namely, albendazole (Medenlab, 50 mg/kg suspension), niclosamide (Bayer, 500 mg tablet), or ivermectin (Riverfarma, 2 mg tablet).

One day after the last oral dose of each treatment, all of the mice were euthanized, and the cysticerci were recovered from the peritoneal cavity and observed under a stereoscopic microscope.

**In vivo immunogenic capacity of CS-WT and CS-23 *C. papaya* against *T. crassiceps* cysticerci.** 28 female BALB/cAnN mice were orally administered with 200  $\mu$ L of a call suspension of CS-WT (10 mg/mL), CS-23 (10  $\mu$ g/mL), or both at day 0 as well as 15 days later. 2 weeks later, each mouse was infected with 10 *T. crassiceps* cysticerci that were less than 0.2 mm in size and was sacrificed 30 days later.

**Histopathology.** *T. crassiceps* cysticerci were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, and sectioned in slides of 3  $\mu$ m. The slides were stained with hematoxylin and eosin (HE).

**Statistical analysis.** The data presented with a normal distribution. Therefore, the statistical comparisons between the individual means of different treatments were carried out using a *t* tests of variance, and Tukey's tests were conducted to determine whether there were significant differences between the means of the two groups. The data were considered to be statistically significant at  $P \leq 0.05$ .

**Data availability.** The data will be available upon publication and request for peer review.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We give special thanks to the MVZs Octavio Ramos, Gilberto Morales, María Alejandra Márquez, Leticia León, José Juan Martínez, and Ramón Méndez for their support with some of the experiments that were performed. We also thank Maribel Nieto Miranda and LL Omar Rangel for the technical support as well as Georgina Díaz and Daniel Garzón in the Biological Models Unit for providing the mice that were employed in this study as well as the animal care. We thank the Biotechnological Research Center of the UAEM and the Biomedical Research Institute (UNAM) for the facilities that were granted to carry out this project as well as the National Council of Science and Technology for the scholarship (award number 732070).

This work was supported by the PROFEXCE 2020 Programa de Fortalecimiento a las Excelencia Educativa and by the Institutional Program "Programa de Investigación para el Desarrollo y la Optimización de Vacunas, Inmunomoduladores y Métodos Diagnósticos del IIBO" (PROVACADI).

#### REFERENCES

- World Health Organization. 2015. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007–2015.
- Filbot M, Guzman J, Cantillo L, Gómez L, Sánchez M, Acosta BM, Sarmiento-Rubiano L. 2015. Prevalencia de parásitos intestinales en niños del Área Metropolitana de Barranquilla, Colombia. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 67. [http://scielo.skl.ci/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602015000300002&lng=es&nrm=iso](http://scielo.skl.ci/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602015000300002&lng=es&nrm=iso).
- Fragoso G, Lamoyi E, Mellor A, Lomeli C, Hernández M, Sciutto E. 1998. Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infect Immun* 66:760–764. <https://doi.org/10.1128/IAI66.2.760-764.1998>.
- Del Arrenal IPM, Rubio ER, Ramirez J, Rendon JL, Escamilla E. 2005. Cyanide-resistant respiration in *Taenia crassiceps* metacystode (cysticerc) is explained by the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producing side-reaction of respiratory complex I with O<sub>2</sub>. *Parasitol Int* 54:185–193. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2005.04.003>.
- Morales-Montor J, Larralde C. 2005. The role of sex steroids in the complex physiology of the host-parasite relationship: the case of the larval cestode of *Taenia crassiceps*. *Parasitology* 131:287–294. <https://doi.org/10.1017/S0031182005007894>.
- Palomares-Alonso F, Toledo A, Palencia Hernández G, Jung-Cook H, Fleury A. 2020. Effect of dexamethasone on albendazole cysticidal activity in experimental cysticercosis by *Taenia crassiceps* in BALB/c mice: in vitro and in vivo evaluation. *Exp Parasitol* 208:107801. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107801>.
- Larralde C, Sotelo J, Montoya RM, Palencia G, Padilla A, Govezensky T, Diaz ML, Sciutto E. 1990. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Arch Pathol Lab Med* 114:926–928.
- Willms K, Zurabian R. 2010. *Taenia crassiceps*: in vivo and in vitro models. *Parasitology* 137:335–346. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991442>.
- Sciutto E, Fragoso G, Larralde C. 2011. *Taenia crassiceps* as a model for *Taenia solium* and the 53Pac vaccine. *Parasite Immunol* 33:79–80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2010.01257.x>.
- Bobes RJ, Estrada K, Rios-Valencia DG, Calderón-Gallegos A, de la Torre P, Carrero JC, Sanchez-Flores A, Lacleite JP. 2022. The genomes of two

- strains of *Taenia crassiceps* the animal model for the study of human cysticercosis. *Front Cell Infect Microbiol* 12:876839. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.876839>.
11. Geerts S, Gryseels B. 2000. Drug resistance in human helminths: current situation and lessons from livestock. *Clin Microbiol Rev* 13:207–222. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.2.207>.
  12. Cock IE, Selesho M, Van Vuuren SF. 2018. A review of the traditional use of southern African medicinal plants for the treatment of selected parasite infections affecting humans. *J Ethnopharmacol* 220:250–264. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.04.001>.
  13. Kaur K, Kaur A. 2017. Papaya performance under various growing conditions cv. Red Lady 786. *Agricultural Res Communication Centre* 37:290–293. <https://doi.org/10.18805/ag.D-4681>.
  14. Luyendo P. 2012. *Medicina natural*. <http://mednaturagradafamilia.blogspot.com/2012/07/la-papaya.html>.
  15. Fragoso G, Hernández M, Cervantes-Torres J, Ramírez-Aquino R, Chapula H, Villalobos N, Segura-Velázquez R, Figueroa A, Flores I, Jiménez H, Adelfo L, Rosas G, Galvez L, Pezart E, Monreal-Escalante E, Rosales-Mendoza S, Vaquez LG, Sciutto E. 2017. Transgenic papaya: useful platform for oral vaccines. *Planta* 245:1037–1048. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2658-z>.
  16. Hernández M, Rosas G, Cervantes J, Fragoso G, Rosales-Mendoza S, Sciutto E. 2014. Transgenic plants: a 5-year update on oral antipathogen vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 13:1523–1536. <https://doi.org/10.1586/14760584.2014.953064>.
  17. Hernández M, Cabrera-Ponce JL, Fragoso G, López-Casillas F, Guevara-García A, Rosas G, León-Ramírez C, Juárez P, Sánchez-García G, Cervantes J, Acero G, Toledo A, Cruz C, Bojail R, Herrera-Estrella L, Sciutto E. 2007. A new highly effective anti-cysticercosis vaccine expressed in transgenic papaya. *Vaccine* 25:4252–4260. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.02.080>.
  18. Ortiz Calterpa A, Hernández M, Pérez AL, Aguilar L, Guzmán C, Ayón-Núñez DA, Fragoso G, Bobes R, Lopez ME, Sciutto E, Villareal ML. 2022. Improvement of cell suspension cultures of transformed and untransformed *Carica papaya* cell lines, towards the development of an antiparasitic product against the gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus*. *Front Cell Infect Microbiol* 12:1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.958741>.
  19. Martínez-González JJ, Guevara-Flores A, Rendón JL, Del Arenal IP. 2015. Auranofin-induced oxidative stress causes redistribution of the glutathione pool in *Taenia crassiceps* cysticerci. *Mol Biochem Parasitol* 201:16–25. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.05.001>.
  20. Fragoso G, Esquivel-Guadarrama F, Santana MA, Bobes RJ, Hernández B, Cervantes J, Segura R, Goldbaum FA, Sciutto E, Rosas G. 2011. Heterologous prime-boost oral immunization with GK-1 peptide from *Taenia crassiceps* cysticerci induces protective immunity. *Clin Vaccine Immunol* 18:1067–1076. <https://doi.org/10.1128/CVI.05030-11>.
  21. Betancourt MA, de Aluja AS, Sciutto E, Hernández M, Bobes RJ, Rosas G, Hernández B, Fragoso G, Hallaf-Calleros C, Aguilar L, Flores-Peréz I. 2012. Effective protection induced by three different versions of the porcine S3Pvac anticysticercosis vaccine against rabbit experimental *Taenia piliformis* cysticercosis. *Vaccine* 30:2760–2767. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.02.022>.
  22. Satija F, Nansen P, Bjørn H, Murtini S, He S. 1994. Effect of papaya latex against *Ascaris suum* in naturally infected pigs. *J Helminthol* 68:343–346. <https://doi.org/10.1017/s0022149x00001619>.
  23. Satija F, Nansen P, Murtini S, He S. 1995. Anthelmintic activity of papaya latex against patent *Heligmosomoides polygyrus* infections in mice. *J Ethnopharmacol* 48:161–164. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(95\)01298-r](https://doi.org/10.1016/0378-8741(95)01298-r).
  24. Mansur FAF, Luoga W, Behrke JM, Buttle DJ, Duce IR, Garnett MC. 2021. Developing novel anthelmintics: the stability of cysteine proteinase activity in a supernatant extract of papaya latex. *Heliyon* 7:e08125. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08125>.
  25. Okenyi JA, Ogunlesi TA, Oyelami OA, Adeyemi LA. 2007. Effectiveness of dried *Carica papaya* seeds against human intestinal parasitosis: a pilot study. *J Med Food* 10:194–196. <https://doi.org/10.1089/jmf.2005.065>.
  26. Stepek G, McCormack G, Birnie AJ, Page AP. 2011. The astacin metalloproteinase moulting enzyme NAS-36 is required for normal cuticle ecdysis in free-living and parasitic nematodes. *Parasitology* 138:237–248. <https://doi.org/10.1017/S0031182010001113>.
  27. Buttle DJ, Behrke JM, Bartley Y, Etheikha HM, Bartley DJ, Garnett MC, Donnan AA, Jackson F, Lowe A, Duce IR. 2011. Oral dosing with papaya latex is an effective anthelmintic treatment for sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Parasit Vectors* 4:36. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-36>.
  28. Storey M, Mas A, Robert-Moreno A, Pecoraro M, Ontañón MC, Di Giacomo V, Yosef R, Pilpel N, Krizhanovsky V, Sharpe J, Keyes WM. 2013. Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* 155:1119–1130. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.041>.
  29. Eboh OJ, Onuoha T, Christopher PC. In press. Evaluation of the parasites associated with *Talinum fruticosum*. *Afr J Agric Res*.
  30. Guzmán H, Díaz RS, González HMM. 2017. *Plantas medicinales la realidad de una tradición ancestral*. INIFAP.
  31. Salazar Díaz JS. 2021. Utilización de semilla de papaya (*Carica papaya*) y palco (*Chenopodium ambrosioides*) como antiparasitario natural en perros de la ciudad de Latacunga. Universidad Técnica de Cotacachi (UTC).
  32. Quispe A, Roca AR, Paz CA. 2010. Actividad antiparasitaria del ajo y el albendazol en niños en edad escolar en Portachuelo-Santa Cruz. Universidad Cristina de Bolivia. <https://pdfslide.com/documents/actividad-antiparasitaria-del-ajo-y-el-albendazol-el-quispe-es-ovalado-con-cuatro.html?page=1>.
  33. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. The folin phenol protein quantification method of protein. *J Biol Chem* 193:265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6).
  34. Freeman RS. 1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (cestoda). *Can J Zool* 40:969–990. <https://doi.org/10.1139/z62-086>.
  35. Njenga C, Wouamba S, Yamthe L, Dize D, Tchataat B, Tsouh P, Fouofo MN, Jouda JB, Nijakou BL, Sewald N, Kouam SF, Boyom FF. 2021. Bio-guided isolation of anti-leishmanial natural products from *Diospyros graciliscens* L. (Ebenaceae). *BMC Complement Med Ther* 21:106. <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03279-1>.
  36. Núñez G, Villalobos N, Herrera CP, Navarrete-Perea J, Méndez A, Martínez-Maya JJ, Bobes R, Fragoso G, Sciutto E, Aguilar L, Del Arenal IP. 2018. Anti-GK1 antibodies damage *Taenia crassiceps* cysticerci through complement activation. *Parasitol Res* 117:2543–2553. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5943-2>.

Cuernavaca, Morelos, a 18 de enero del 2023.

## VOTOS APROBATORIOS DE TESIS

Los integrantes de la Comisión Revisora de la tesis titulada: "**Hacia el desarrollo de un nuevo antiparasitario basado en células en suspensión de *Carica papaya***", que presenta la **C. Cynthia Alejandra Guzmán Medina**, del Programa de Posgrado Doctorado en Ciencias Naturales, bajo la dirección de la DRA. MARÍA LUISA TERESA VILLARREAL ORTEGA y codirección de la DRA. EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE, han determinado que el documento reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado, por lo que emiten su **VOTO APROBATORIO**.

### Comisión Revisora de tesis (firma electrónica)

DRA. EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE (IIB UNAM)

DRA. ANABEL ORTIZ CALTEMPA (CEIB UAEM)

DR. RAÚL JOSÉ BOBES RUIZ (IIB UNAM)

DRA. LILIANA AGUILAR MARCELINO (INIFAP)

DR. JOSE DE JESUS ARELLANO GARCIA (CEIB UAEM)

DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA (CEIB UAEM)

DR. RAMON SUAREZ RODRIGUEZ (CEIB UAEM)

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

**Sello electrónico**

**RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ** | Fecha: 2024-01-18 11:16:17 | Firmante  
sXBURJhEhG0eARdo7a5kxWLEkEp9oe3UM89qvt5Gdhmw00evGm8auHPDqqt1bx+5X7ozEFDYypJ8KR8F10mVluNWqbtvCN98mUjKdxhM9y2U0AqpdjNLwmOsdCaW0X3+kw+cQp1qk9zvh48kd1T8ZwR0Y21JugqpqfN00MW18KLUQbGJkr5p0BcuMyXqdfUrbCF9BypP1LrCagx0EQBoatCQkCvzZxKPAIbs2cPgJ88k29++β1.5J9eUaCAm2Zd4p87AIPtpU7rv54E5suw54y6SvPHYatN4bc+NxYEqeBKErVt2pCkH0YZ2zr9Lbew==

**JOSE DE JESUS ARELLANO GARCIA** | Fecha: 2024-01-18 11:26:22 | Firmante  
B87UKUpVdF6nauc+5pd10XcUvY8x0CMUuhnbzRRYau8hTxWkmZiaxb4eqqjK9+Uxzh8WpTY+QRwKLMHGMmOvw757yurbWyWC0IQQqFoV14xGnbX0mgs+2BssL3+9NMUhzHw1Bqgf712PKLCQv8DbyxexChZw+uAmd8d0vFqLUPAwrMHL5qEYVC8MhwhHqVA+P2a+3z7sgHd2E18agRq4wZu4eE4ea78r9kqubcpi4AFILUP+vEepwds0CHzFryWu80V0YUmb7KEvu03VwAaCqM10T0BSBR289Njowwp071gJyK08Th0xg==

**ANABEL ORTIZ CALTEMPA** | Fecha: 2024-01-18 12:07:36 | Firmante  
To77kfa+EuEbe8FbJhgYz1ppCw9yV8TT3Q8VKSv+4XkoHDqYwCwJtu08glS3BK2mt09NPPZXd9XpKdHMMPmve8h3bqWEOgr15GZ4uuKCJMN9h4k2RNgYVC1u4Uw0qgP8Aocw8kPZKAKZPwgrsdGhonW8FT2DLKv8ALE8PPOCbt7dJMN28d009WdyEvmt0gufc34zTwdy28Brdv8UAFLd8CptW9t2gmLISWVRn7Kau65FDwYD8amk17rK4wWuA70WwJL8ecwTzLq8qY185Zuch8BEurUB8HWWUwv4FVRO==

**ALEXANDRE TOSHIRECO CARDOSO TAKETA** | Fecha: 2024-01-18 12:19:08 | Firmante  
MynoCAX58SpVIOG8bkdJduWmu90nULqggn3Nwpsk8UTxLZydf84LFGpPNI8eBFk2Jbz8MWO1X20e9mMM1Kp8Om42GnvXS+mrFMM8q+Z5urgrTshx0XCDevRrFwJ+00vBqdVz8WPvBTK7z8MnT+vgU8uVbdMMZaTEGujyCFz+eeGq8rLQL4C784X0v0FWx2G2jcg28OC08xM8CFAQ8d38qB4YKU0yKJUnD8MTqJ20KJF3RFD8XV1U485L1hg758TmAdKCSOnba8zVOTDXumdM8KvRWHPHZLg2SEUvZACkOS3VpbCp475Oag==

**LILIANA AGUILAR MARCELINO** | Fecha: 2024-01-18 13:07:57 | Firmante  
o5ZHLQWAnXoa72apQeSZFK0kuLCL9Am0XgEusv4WQBSmkYbE8RJD15QPoR6uc47Wv8d9ZAb10Y4k46CwN06Jpy1TH10GaX8Mv00yY75mMQR86rCHFZRc+dLYSggjP1VQ8LJ2CA0MXAaZasguRw8LLIvu+uLzxdjAbLzLSatpMSqQF13d+P2H3gSgF83j+eJO7WTLyld8bCmQCBStha1JYUWpUzOLEu8WamSUCZbuKPEshTuβRqngjWY+cVEL8MjRhDhQMH8gCdc8M8SafzTPeDq8BdPqK25+FwByK2w8mL3oucE895UQ==

**EDDA LYDIA SCUTTO CONDE** | Fecha: 2024-01-22 13:15:48 | Firmante  
rK78J5r0xbpaVnmUyD03F883HGaLNeVYauN90UyN98qDwDM7Kds84V5+ocE+sd2Y3WkbdLzyKHUJHacSamuw10OayRO8ALSA8d5GkuYSQp7AYsZ8x8r88rEQpLHY0S8YQXn0cR8aUaGudFb70/QePhX0tmphV8+LNAW1TEPK7v1KvKqk8s5j2t8d280y+yzSh0ZP8adpNE888Xw9LU8ghpUD38w7ppVSezTLz0xq8F82p2cy78hLTfPL1ThEutVn8GvR8LUKE85YpdG7ZJau8EppWu88g8pLj08AGSNNpL8RYOOLQ==

**RAÚL JOSÉ BOBES RUIZ** | Fecha: 2024-01-22 14:11:41 | Firmante  
DJCwqg1yub0TIXu8GTSLK2wqQnmq20Wuucx8B5z1u5FMovLNGZUpNal0z08bXKau8p3PPCEMB+8Av01mNkLQxJD0BP9kVlyG0Gx00aH2WTP770qFwaEa+gMEw8td0g888PvCPyz8Fm46XTb4J4SLUu81cndpKp8H8u8Fgpye8m4zZL04z75p02UQqP0V8X08MUUNdgm78p8vZyKqL8DTL8JptqKqF8WVUaL+WHdXGCPV1Ktq958L8v8v8CymE8kY08d8A38z7VrWHX88ag88n8GZ2ChmPYJvJ2K8PA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



FO8xW80K

<https://firma.uaem.mx/hoRe/pud8/FQ10EPDRyhEPOGLU8hkaQ7aJ8>