



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESTUDIO SOBRE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA *in vitro* DE LA FRACCIÓN PdR-2 DE *Pleurotus djamor* Y EL ÁCIDO LINOLEICO COMERCIAL EN *Haemonchus contortus*

P R E S E N T A:

MVZ. XÓCHITL ALONDRA PÉREZ MONTERO

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
**MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
DESARROLLO RURAL**

DIRECTORES DE TESIS:

DR. FERNANDO IVAN FLORES PÉREZ

DRA. LILIANA AGUILAR MARCELINO

CUERNAVACA, MORELOS

NOVIEMBRE DE 2022

**ESTUDIO SOBRE LA ACTIVIDAD NEMATOCIDA *in vitro* DE LA FRACCIÓN PdR-2
DE *Pleurotus djamor* Y EL ÁCIDO LINOLEICO COMERCIAL EN *Haemonchus
contortus***

Tesis realizada por la MVZ XÓCHITL ALONDRA PÉREZ MONTERO bajo la dirección del comité asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el título de:

MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL

COMITÉ REVISOR

CO- DIRECTORA DE TESIS:

DRA. LILIANA AGUILAR MARCELINO

CO- DIRECTOR DE TESIS:

DR. FERNANDO IVÁN FLORES PÉREZ

REVISORA:

DRA. MARIANA PEDERNEIRA ROMANO

REVISORA:

DRA. VIRGINIA GUADALUPE GARCÍA RUBIO

REVISOR:

DR. VIRGINIO AGUIRRE FLORES

REVISOR:

DR. JOSÉ ERNESTO SÁNCHEZ VÁSQUEZ

Cuernavaca, Morelos, noviembre de 2022.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional De Investigaciones Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por el financiamiento del proyecto del estudio metabólico del hongo comestible *Pleurotus djamor* con número 139335341. Al Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI) del INIFAP, doctores y personal administrativo por el acceso a los laboratorios para la realización de experimentos *in vitro* y por el cariño y apoyo brindado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada, con número de apoyo 772681, para la realización de los estudios de maestría.

A la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Morelos (UAEM), por abrirme sus puertas y permitirme llevar a cabo el posgrado.

A la Dra. Liliana Aguilar Marcelino, mi codirectora de tesis, a quien admiro; agradezco sus enseñanzas tanto en lo personal como en lo profesional, sus palabras de aliento y motivación, por la confianza depositada en mí y por la orientación brindada, indispensable para la realización del presente proyecto.

Al Dr. Fernando Iván Flores Pérez, mi director de tesis; agradezco el apoyo brindado, por sus palabras de aliento y ánimo, por estar presente en la toma de materias virtuales para despejar dudas y potencializar mi aprendizaje y por su dirección en la realización de este estudio.

A la M.C. Patricia Vargas Uriostegui, por su apoyo en la realización de los experimentos *in vitro*, por sus valiosos comentarios, recomendaciones y consejos, pero, sobre todo, agradezco su amistad, su tiempo, sus pláticas enriquecedoras y sus palabras de aliento y ánimo, de ella aprendí mucho más de lo profesional.

A todo el grupo de laboratorios por compartirme sus conocimientos y apoyarme con la mejor actitud, por su compañía y buena vibra: Julio, Susan, Sarahí, Lilia, Antonio, Jaime, Perlita, Angelita, Marilem, Vicky, Benjamín y Gil, gracias.

A mi comité tutorial por su apoyo con comentarios y sugerencias en la elaboración de este proyecto, y sobre todo a la Dra. Virginia García Rubio quien me ayudó a retroalimentarme y me colaboró en la búsqueda de productores. Agradezco a los profesores: Dra. Claudia Hallal Calleros, Dr. Antonio Castillo Gutiérrez y al Dr. Agustín Orihuela Trujillo, quienes sus valiosos conocimientos en las diferentes materias impartidas aportaron a mi crecimiento profesional.

DEDICATORIA

A mis abuelitos, Miguel Montero Chávez y Judith Aranda Sánchez quienes fueron el mayor pilar en mi formación académica desde la preparatoria y fungieron como mis padres desde mi nacimiento. En memoria de mi mamá Judith[†] que siempre se sintió orgullosa de mí y me alentaba siempre a ir por más y no conformarme, su recuerdo lo llevo siempre conmigo.

A mi mamá Alma Cristina Montero Aranda que ha confiado en mis capacidades y me ha dado consejos para ser mejor cada día. La segunda madre de mi hijo Mateo, he podido llegar hasta aquí gracias a su apoyo en el cuidado de mi hijo durante gran parte de la maestría.

A mi hijo Mateo Ortiz Pérez quien me impulsa a visualizar un mejor futuro para él y trabajar duro para hacerlo tangible, él con su amor me da ánimos cuando siento que no puedo, Mateo me ha dado grandes lecciones sin saberlo y me estimula a mejorar como madre y como persona.

A mi tía Martha Elena Montero Aranda, quien me ha dado sus valiosos consejos y me ha apoyado con el cuidado de mi hijo ahora que mi mamá se fue a trabajar a otro Estado y requiero viajar constantemente a Cuernavaca.

A mi novio Luis Octavio Tapia Guzmán, por su apoyo incondicional en la realización de cada meta que me propongo, por su amor, comprensión y paciencia durante la ejecución de este proyecto, por acompañarme y cuidarme al no dejarme sola en la toma de muestreos a lugares lejanos y desconocidos.

A mi tío Miguel que me ha brindado su apoyo siempre por sus valiosos consejos para mejorar profesionalmente y por hacerme ver que puedo y soy capaz de hacerlo.

A mi hermano Miguel, a mi tía Edith y a mis primos Víctor, Braulio, Jess, Cassandra, Alán, Rocke, quienes con su amor y presencia me motivan a lograr mis objetivos.

¡LOS AMO!

Índice

Contenido	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1 Nematodos gastrointestinales	4
2.2 Generalidades de los NGI	4
2.3 <i>Haemonchus contortus</i>	5
2.4 Control convencional.....	11
2.5 Resistencia antihelmíntica	13
2.6 Control no convencional	14
2.7 Hongos	15
III. JUSTIFICACIÓN.....	22
IV. HIPÓTESIS	23
V. OBJETIVOS.....	24
5.1 General	24
5.2 Específicos	24
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
6.1 Localización.....	25
6.2 Diagrama de proceso experimental	26

6.3 Obtención de material biológico	27
6.4 Pruebas <i>in vitro</i>	29
6.5 Análisis estadístico	34
VII. RESULTADOS	35
VIII. DISCUSIÓN	45
IX. CONCLUSIONES	49
X. PERSPECTIVAS	50
XI. LITERATURA CITADA	51
XIII. APÉNDICES	61
12.1 Apéndice 1	61
12.2 Apéndice 2	61
12.3 Apéndice 3	62
12.4 Apéndice 4	63

Índice de figuras

Contenido	Página
Figura 1. <i>Haemonchus contortus</i> adultos en abomaso de cabra (<i>Capra aegagrus hircus</i>) infectada.....	6
Figura 2. Parte anterior de <i>H. contortus</i>	7
Figura 3. Adultos de <i>H. contortus</i> obtenidos de cabras (<i>Capra aegagrus hircus</i>) infectadas naturalmente.	8
Figura 4. Sección transversal de <i>Haemonchus contortus</i> adulto, en histología.	10
Figura 5. Ciclo biológico de <i>Haemonchus contortus</i>	11
Figura 6. Basidiomas de <i>Pleurotus djamor</i>	16
Figura 7. Instituciones involucradas en el desarrollo del presente trabajo.	25
Figura 8. Diagrama del proceso experimental.	26
Figura 9. Ubicación de rastro para recolección de adultos de <i>Haemonchus contortus</i>	27
Figura 10. Representación del proceso de colecta de adultos de cabras infectadas.	29
Figura 11. Resultados del porcentaje de efectividad nematicida obtenido en la evaluación <i>in vitro</i> de la fracción PdR-2 de <i>P. djamor</i> contra larvas infectantes (L3) con vaina de <i>Haemonchus contortus</i>	35
Figura 12. Porcentajes de mortalidad obtenidos en las pruebas <i>in vitro</i> de la fracción PdR-2 en adultos de <i>H. contortus</i> a la hora de incubación.	36
Figura 13. Fotografías de adultos de <i>H. contortus</i> de cada tratamiento	37
Figura 14. Cortes histológicos con tinción de hematoxilina y eosina de nematodos adultos de <i>H. contortus</i> incubados con ácido linoleico a 5 mg/mL y dos grupos testigo (DMSO 0.1% e IVM 0.1%).....	40
Figura 15. Cortes histológicos de adultos de <i>H. controtus</i> , con mediciones morfométricas de la membrada externa.....	41

Figura 16. Gráfica de comparación de medias de grosor de epicutícula de adultos de *H. contortus*, DMSO 0.1% (control negativo), ivermectina 0.1% (control positivo) y ácido linoleico comercial (tratamiento). 42

Figura 17. Ultraestructura externa de *H. contortus* adulto en contacto con DMSO 0.1% (control negativo), IVM 0.1% (control positivo) y ácido linoleico comercial (tratamiento) bajo condiciones *in vitro*. 43

Figura 18. Diseño experimental de bioensayo de la fracción PdR-2 del hongo *P. djamor* contra adultos de *H. contortus*..... 63

Índice de cuadros

Contenido	Página
Cuadro 1. Principales grupos de antihelmínticos.	12
Cuadro 2. Grupos de metabolitos secundarios, descripción y estructura.....	17
Cuadro 3. Diferentes especies del género <i>Pleurotus</i> , notificados con actividad nematocida contra <i>H. contortus</i>	19
Cuadro 4. Procedimientos <i>in vitro</i> con metabolitos secundarios, en diferentes estadios de <i>H. contortus</i>	20
Cuadro 5. Tratamientos y concentraciones utilizadas en la prueba <i>in vitro</i> de larvas infectantes (L3) con vaina y fracción PdR-2 a partir de 80 mg/mL.	30
Cuadro 6. Tratamientos y concentraciones utilizadas en el bioensayo de adultos de <i>H. contortus</i> y fracción PdR-2 a partir de 5 mg/mL.	31
Cuadro 7. Tratamientos y concentraciones utilizadas en la prueba <i>in vitro</i> de adultos de <i>H. contortus</i> contra el ácido linoleico comercial a partir de 5 mg/mL.	32
Cuadro 8. Mortalidad de adultos de <i>H. contortus</i> causado por el ácido linoleico comercial 30 minutos después de la exposición.	39
Cuadro 9. Concentración letal 50 y concentración letal 90 de ácido linoleico en adultos de <i>H. contortus</i>	39

RESUMEN

La necesidad de buscar nuevas moléculas que ayuden a mitigar la resistencia antihelmíntica contra el nematodo gastroentérico de mayor impacto económico en la ovinicultura: *H. contortus*, conlleva a explorar alternativas eco-amigables; siendo los hongos una fuente importante de principios bioactivos con propiedades antihelmínticas. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto nematicida *in vitro* que posee la fracción PdR-2 del hongo comestible *P. djamor* en larvas infectantes y adultos de *H. contortus* y ácido linoleico comercial en adultos de *H. contortus*. Los bioensayos se realizaron en placas de microtitulación y cajas de Petri. El diseño experimental se conformó de cinco concentraciones diferentes de la fracción PdR-2, en larvas infectantes (L3) con vaina (80, 60, 40, 20, 10 mg/mL) y adultos (5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 mg/mL) y el ácido linoleico en adultos a (5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 0.156 mg/mL). Posteriormente se obtuvieron porcentajes de mortalidad de larvas y adultos con respecto al grupo control mediante la fórmula de Abbott corregida: % de mortalidad = $\frac{\text{media del grupo control} - \text{media del grupo tratado}}{\text{media del grupo control}} * 100$. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) con los resultados obtenidos en cada experimento con la fracción PdR-2, a las 72 h para larvas infectantes (L3) con vaina y 1h para adultos, en la prueba *in vitro* con ácido linoleico contra adultos se tomaron resultados a los 50 minutos postconfrontación, adicionalmente se realizaron pruebas Tukey con $p=0.05$ para una comparación de medias entre tratamientos utilizando el paquete estadístico "R" commander. En los resultados de las pruebas *in vitro* de la fracción PdR-2 en larvas infectantes (L3) se obtuvo un 100% de mortalidad a 80 mg/mL y a 60 mg/mL 87.5% a las 72 h de incubación; en adultos de *H. contortus* se observó todo lo contrario, a mayor concentración de la fracción mayor viabilidad del nematodo en 1h y 18h de incubación. En la evaluación *in vitro* del ácido linoleico comercial en adultos de *H. contortus*, se tuvo un porcentaje de mortalidad del 75% a 5 mg/mL a los 50 minutos de incubación. En la observación de histoarquitectura y ultraestructura se visualizaron daños en el tegumento del nematodo, por el ácido linoleico comercial.

Palabras clave: Hongos comestibles, moléculas bioactivas, antihelmínticos, ganadería sustentable.

I. INTRODUCCIÓN

La producción de pequeños rumiantes, como los ovinos y caprinos es una actividad que ha experimentado un crecimiento a nivel mundial en los últimos años, ya que en el 2010 se generaron 13.5 toneladas de carne y para el año 2020 se registró una producción de 16 millones de toneladas (FAOSTAT, 2020)

De esos 16 millones de toneladas, el continente americano produce más de 500 mil toneladas de carne, lo que es un equivalente al 6.4% de la producción global. Los Estados Unidos Mexicanos, producen alrededor de 105 mil toneladas de carne anuales, con 17,556,602 de cabezas ovinas y caprinas (FAOSTAT, 2020; SIAP, 2020). Sin embargo, las parasitosis que afectan a la ganadería tienen un impacto económico desfavorable, principalmente las provocadas por NGI (nematodos gastrointestinales) debido a que han limitado la producción de ovinos y caprinos a nivel mundial, principalmente en zonas tropicales y subtropicales, afectando negativamente la producción de grandes y pequeños rumiantes en condiciones de pastoreo, especialmente animales jóvenes (Torres-Acosta y Hoste, 2008; Esteban-Andrés *et al.*, 2013).

En el continente americano se han notificado problemas de NGI en poblaciones de ovinos y caprinos, principalmente en países como Colombia, Ecuador, Perú y México (González-Muñoz, 2014; Padilla-Amor, 2020; Ninamancco *et al.*, 2021) en este último se han reportado altas prevalencias de NGI, principalmente de *H. contortus* n Sonora, Tabasco, Hidalgo y Chiapas por mencionar algunos (González *et al.*, 2011; Barreto-Torres, 2014; Munguía-Xóchihua *et al.*, 2018).

Los NGI tienen un efecto negativo en el desarrollo y crecimiento de los animales; presentan signos clínicos como: edema generalizado, anemia, anorexia, debilidad, baja producción de lana, leche y carne; (Dutta *et al.*, 2017; Torres-Acosta *et al.*, 2021), como consecuencia, las producciones se ven afectadas económicamente. Varios estudios mencionan que existen bajas económicas considerables provocadas por NGI (Bulman, 2012; Zapata-Salas *et al.*, 2016; Antonio-Irineo *et al.*, 2021) y aunque no se mencionan las cifras de las pérdidas en las producciones de ovinos y caprinos, Rodríguez-Vivas *et*

al. (2017), estimaron mermas de más de 8,864 millones de pesos mexicanos en el 2017, por NGI en bovinos, lo que demuestra que estos parásitos son un problema grave que hay que resolver.

En pequeños rumiantes, el nematodo de mayor importancia es *H. contortus*, se aloja en el abomaso formando nódulos en la mucosa provocando inapetencia, es hematófago, lo que ocasiona anemia en los animales (Rojas *et al.*, 2012), su incidencia es mayor en climas tropicales y subtropicales; sin embargo, ha logrado adaptarse creando zonas endémicas (Munguía-Xóchihua *et al.*, 2018).

Con la finalidad de establecer un control eficaz de los nematodos gastrointestinales se han propuesto diversas estrategias como son el uso de antihelmínticos químicos, como los benzimidazoles, imidazotiazoles y lactonas macrocíclicas que son considerados de amplio espectro, el pastoreo rotativo, entre otras que se pueden considerar como tradicionales que al ser empleadas en las unidades de producción ovinas han contribuido a generar diversas problemáticas, por ejemplo, el uso indiscriminado e inadecuado de fármacos ha desencadenado el problema de la resistencia antihelmíntica (RA), lo que conduce a utilizar dosis más altas de estos fármacos y en periodos más cortos (Medina *et al.*, 2014; Anziani y Fiel, 2015); además, en los productos destinados para consumo humano (leche y carne), permanecen residuos de principios activos de estos fármacos, afectando al hombre indirectamente, por otro lado, la eliminación de estos componentes químicos es vía fecal y orina, lo que provoca un daño al ambiente y organismos benéficos que habitan en él y contribuyen a la desintegración de las heces (Spratt, 1997; Basto-Estrella *et al.*, 2012; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2020).

Tomando en cuenta lo anterior es que se están buscando estrategias sostenibles de control utilizando microorganismos, animales, plantas (Al-Ani *et al.*, 2020) y hongos micro y macromicetos, entre estos últimos los más estudiados han sido los hongos comestibles, del género *Pleurotus* (Rodríguez-Barrera *et al.*, 2021), principalmente moléculas activas (metabolitos secundarios) que actúan como antiparasitarios/antihelmínticos en diferentes estadios de parásitos que afectan plantas y animales (Castañeda-Ramírez *et al.*, 2020).

Los hongos del género *Pleurotus* son productores de proteínas (Cuevas-Padilla, 2019), enzimas (Trejo-López *et al.*, 2017) toxinas (Sánchez y Royse, 2017), péptidos (Mendoza-Jiménez *et al.*, 2017) y metabolitos secundarios que han sido notificados con propiedades antiinflamatorias, hepatoprotectoras, antibacterianas y nematocidas frente a diferentes géneros de nematodos de importancia agropecuaria y salud pública (Pineda-Alegría *et al.*, 2017; Cruz-Arévalo, 2017; González-Cortázar *et al.*, 2020; Castañeda-Ramírez *et al.*, 2020; Panevska *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020).

Lo que sugiere que el uso de los productos naturales derivados de los hongos comestibles podrían ser una alternativa sostenible para el control de los NGI, específicamente de *H. contortus*, por lo que se deriva la presente investigación; con el fin de obtener un nuevo posible principio activo para sustituir los químicos existentes y contrarrestar la resistencia antihelmíntica.

II. ANTECEDENTES

2.1 Nematodos gastrointestinales

Los NGI causan enfermedades gastroentéricas graves en animales de producción a nivel mundial, ya que afecta los aspectos productivos, reproductivos y sanitarios, principalmente en animales en pastoreo. La signología clínica es similar en todas las infecciones causadas por NGI, se debilita el sistema inmunológico, como consecuencia, permite la entrada de patógenos oportunistas y el desarrollo de infecciones secundarias o presencia de infestaciones parasitarias mixtas (Torres-Acosta *et al.*, 2021).

Los nematodos que con mayor frecuencia se encuentran en pequeños rumiantes (ovinos y caprinos) son: *H. contortus*, *Cooperia* sp., *Teladorsagia (Ostertagia) circumcincta*, *Strongyloides* sp., *Trichostrongylus* sp., *Trichuris ovis*, *Bunostomum trigonocephallum* y *Oesophagostomum* sp. (González *et al.*, 2011; Zapata *et al.*, 2016). El nematodo *H. contortus*, es el parásito que más frecuentemente afecta a los ovinos en condiciones de pastoreo (Esteban-Andrés *et al.*, 2013).

2.2 Generalidades de los NGI

Son gusanos delgados, cilíndricos no segmentados, recubiertos por una cutícula con tres zonas (basal, media y cuticular externa) formada por colágeno, la cual es permeable al agua y gases, debajo se encuentra la hipodermis que tiene una estructura sincital, forma cuatro cordones hipodérmicos, en el ventral y dorsal presentan cordones nerviosos y en los laterales los conductos excretores; la cavidad corporal se denomina pseudocele porque no está recubierta de una membrana, está relleno de líquido con alta presión hidrostática, esta recubre a los órganos y funciona como esqueleto (Padilla-Álvarez y Cuesta-López, 2003)

Tienen un tubo digestivo completo, inicia en la cavidad oral (estoma) tienen papilas sensoriales alrededor, tienen estructuras bucales especializadas para la fijación y penetración en la pared intestinal del hospedero, poseen anfidios, que actúan como

quimiorreceptores, posteriormente una faringe o esófago muscular desarrollado, delimitada por un anillo neural, sigue el intestino, un recto y poro excretor, en los machos suele modificarse para formar los órganos copuladores (Beltrán-Gala *et al.*, 2002). El alimento avanza por el tubo digestivo por los movimientos corporales y la expulsión de desechos (amoníaco y urea) es debido a la presión hidrostática del pseudocele.

Los NGI muestran dimorfismo sexual, en la mayoría de las especies el macho es más pequeño que la hembra, se reproducen sexualmente de manera interna. Las gónadas pueden ser únicas o dobles y se comunican al exterior por un poro excretor o cloaca. En machos, la región posterior puede terminar en forma de gancho o en forma de abanico, formando una bursa, tienen espículas copuladoras, su función es mantener abierta la vulva de la hembra en la transferencia de espermatozoides, los cuales no poseen flagelo. En hembras, la vagina desemboca en el poro excretor, localizado en la parte ventral del cuerpo (Padilla-Álvarez y Cuesta-López, 2003; Navone *et al.*, 2017).

El sistema nervioso incluye un anillo formado con fibras, se localiza en el esófago, también tienen un cordón nervioso dorsal y ventral, todos asociados a ganglios donde hay nervios inervando a diferentes receptores y sistemas corporales. Carecen de aparatos respiratorio y circulatorio; sin embargo, hay especies que contienen hemoglobina en el líquido previsceral (Soulsby, 1987; Beltrán-Gala *et al.*, 2002; Padilla-Álvarez y Cuesta-López, 2003).

2.3 *Haemonchus contortus*

Se encuentra distribuido mundialmente en zonas templadas y tropicales; sin embargo, se ha adaptado, creando zonas endémicas (Munguía-Xóchihua *et al.*, 2018). Su órgano diana es el abomaso; es altamente patógeno, ya que es un parásito hematófago y un solo nematodo adulto puede consumir hasta 0.05 mL de sangre a diario, por lo que un ovino con una infección de 5,000 adultos puede perder hasta 250 mL de sangre por día, lo que resulta en una anemia severa, disminución en el peso, problemas en su desarrollo y la muerte (Rojas *et al.*, 2012; Dutta *et al.*, 2017).

Las infecciones por *H. contortus* son muy comunes, debido a su alta prolificidad ya que una hembra es capaz de ovipositar de 5,000 a 10,000 huevos por día (Ninamancco *et al.*, 2021).

2.3.1 Morfología

Macroscópicamente los adultos de *H. contortus* se identifican fácilmente en el abomaso por su gran tamaño (2 – 3 cm). Poseen una cutícula lisa con papilas cervicales en todo el cuerpo, en la parte anterior se ubica la estoma, con la cual se alimentan y se ubican los anfidios (quimiorreceptores), la parte posterior o cola termina en forma afilada redondeada. En cuanto al sistema digestivo, la estoma posee “ganchos” especializados que le permite la fijación e ingesta de sangre de la mucosa abomasal, posteriormente se ubica el esófago, más adelante el intestino y al final una cloaca, que en machos se ve modificada por los órganos sexuales y en hembras un ano (Padilla-Álvarez y Cuesta-López, 2003). En la figura 1 se observan hembras de *H. contortus* en abomaso de una cabra infectada, señalados con flechas rojas (2 – 3 cm).

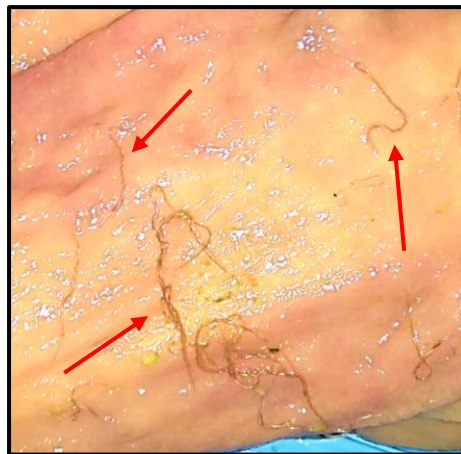


Figura 1. *Haemonchus contortus* adultos en abomaso de cabra (*Capra aegagrus hircus*) infectada, indicado con flechas rojas.

Fuente: Pérez-Montero, 2021.

Microscópicamente, el macho es más pequeño que la hembra, en la parte posterior se ensancha formando algo parecido al abanico, formando la bursa, el testículo desemboca por el los espermiductos (par), que se ensanchan hasta las vesículas seminales y el conducto eyaculador, conectándose con la cloaca y ano, ahí se localiza un saco que contiene a las espículas y músculos que permiten que sobresalgan para la cópula (Cuesta-López, 2003). En hembras, los ovarios se enrollan en espiral alrededor del intestino lleno de sangre, dando una apariencia de “palo de barbero” (Navarrete *et al.*, 1999; Naeem *et al.*, 2020) tienen una solapa vulvar que está situada al comienzo del tercio posterior del cuerpo y se puede observar a partir del estadio L5. En ambos sexos hay papilas cervicales y una lanceta diminuta dentro de la cápsula bucal (Figura 2).

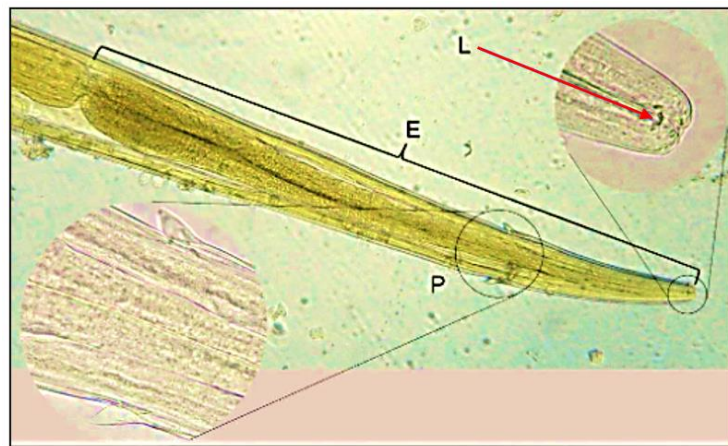


Figura 2. Parte anterior de *H. contortus*.

Se aprecia el esófago (E), la papila cervical (P) y lanceta oral (L) señalado con una flecha roja. Fuente: González-Garduño *et al.*, 2013.

Las larvas infectantes (L3) tienen 16 células intestinales, la parte anterior es estrecha y redondeada y la parte anterior de la vaina está desplazada (González-Garduño *et al.*, 2013; Taylor *et al.*, 2016). El huevo es de tamaño mediano (64-95 x 40-50 μm) y es una elipse ancha regular con paredes laterales en forma de barril y postes anchos de punta plana. La pared de quitina es delgada, de color ligeramente amarillento, lisa y el huevo contiene numerosos blastómeros (Taylor *et al.*, 2016).

En la figura 3 se muestran las partes que compone al adulto de *H. contortus*, con las diferencias sexuales entre hembra y macho.

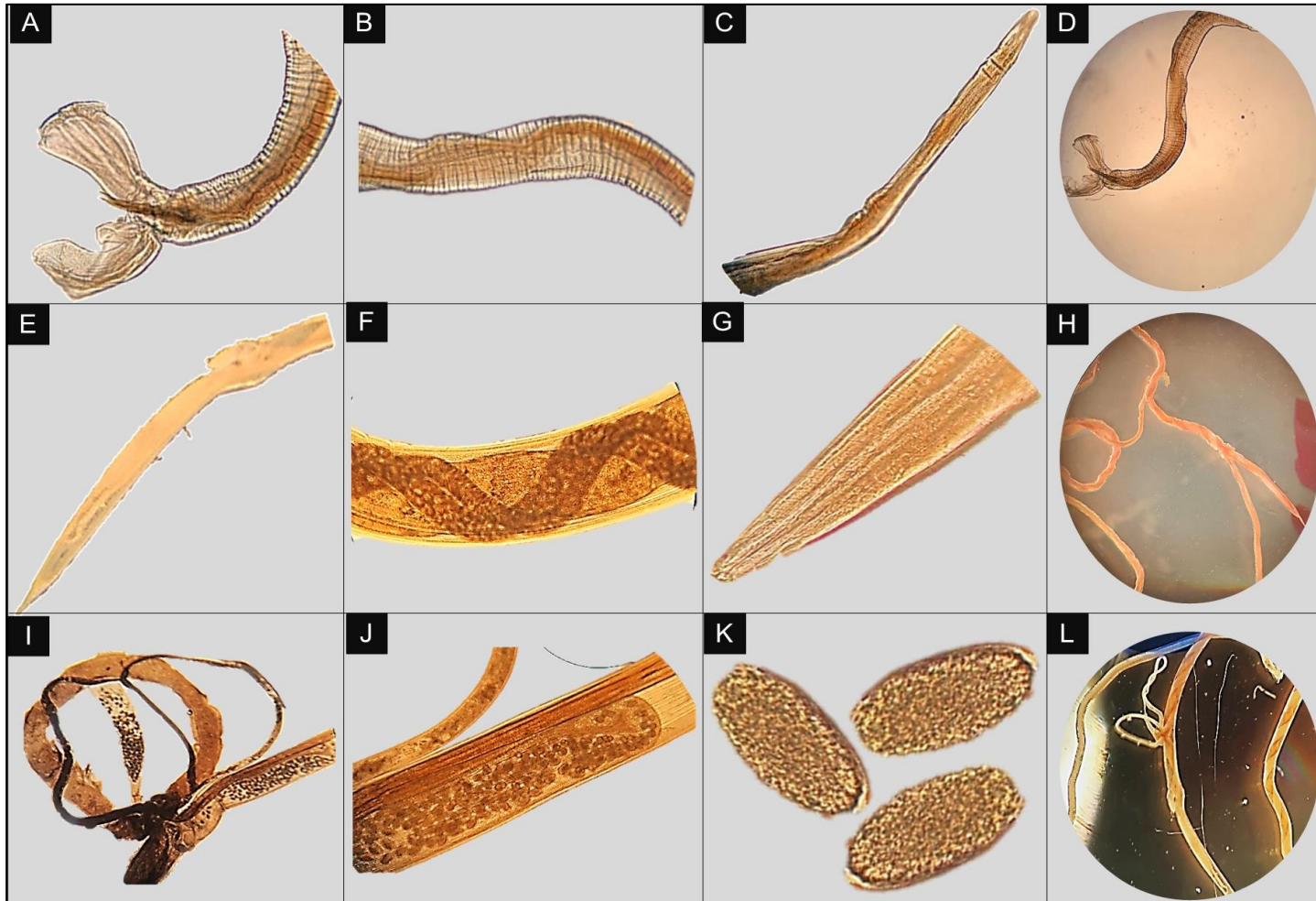


Figura 3. Adultos de *H. contortus* obtenidos de cabras (*Capra aegagrus hircus*) infectadas naturalmente.

3A. Bursa y espículas de macho. 3B. Parte media de macho, donde se encuentran testículos, conductos deferentes y parte de intestino. 3C. Parte de intestino, esófago y lanceta de macho. 3D. Observación de macho adulto, objetivo 10X. 3E. Parte posterior de hembra adulta, se encuentra la solapa vulvar y ano. 3F. Intestino y ovario. 3G. Esófago y lanceta de hembra adulta. 3H. Hembras adultas (microscopio estereoscópico). 3I. Hembra y macho en copulación. 3J. Huevos en útero de hembra adulta. 3K. Huevo ovipositado. 3L. Hembra y macho en copulación (microscopio estereoscópico). Visualizaciones en objetivo 20X. Fuente: Pérez-Montero, 2021.

2.3.2 Descripción tisular de *H. contortus*

La identificación histológica permite observar con mayor detalle el interior de *H. contortus* en cortes transversales de porción anterior, media y posterior del nematodo, se observa de la periferia hacia adentro, la epicutícula que es su capa de protección, se pueden observar una especie de espinas, llamadas crestas cuticulares tanto en machos como en hembras, las cuales le ayudan a adherirse a los tejidos del hospedero, se observa el músculo seguido del pseudocele o celoma, el cual contiene todos los órganos internos, el esófago en la porción anterior, intestino y órganos sexuales de la hembra en porción media y órganos sexuales masculinos en porción posterior (Padilla-Álvarez y Cuesta-López, 2003; Sinhg, 2012) (Figura 4).

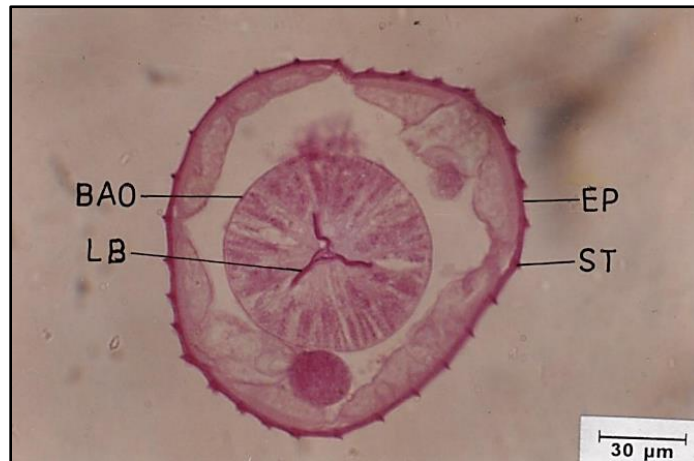


Figura 4. Sección transversal de *Haemonchus contortus* adulto, en histología.

La figura muestra la concentración de carbohidratos en la epicutícula (EP), los puntuales (ST) de la pared corporal con la lámina basal (BAO) y el borde luminal del esófago (LB).

Fuente: Tomado de Sinhg, 2012.

2.3.3 Ciclo biológico

El ciclo biológico de *H. contortus* es directo (sin intermediarios) y ocurre en dos fases (fase de vida libre y fase parásita). La fase de vida libre inicia con la expulsión de huevos del nematodo en las heces del rumiante infectado, dentro del huevo (mórula), se forman la larva (L1), si las condiciones ambientales son idóneas, el huevo eclosiona en 1-2 días (Bowman *et al.*, 2011), después de alimentarse de bacterias, en 2-3 días evolucionan a Larva (L2) y pasados 4-7 días, evolucionan a larva infectante (L3) rodeada de una vaina protectora, lo cual no permite el contacto con el exterior, alimentándose de reservas energéticas acumuladas de L1 y L2, las L3 migran a los pastos para poder ser ingeridas por un hospedador (Navarrete *et al.*, 1999; Boom y Sheath, 2008).

En la fase parásita, la L3 es ingerida por el animal y se desenvaina en rumen, posteriormente migra por los compartimentos digestivos del ovino hasta llegar al abomaso y alojarse ahí convirtiéndose en larva (L4), de 1-2 días penetra las criptas de las glándulas gástricas permaneciendo de 10-14 días. En este proceso puede inhibir su

desarrollo por falta de condiciones óptimas, quedando en un estado de hipobiosis durante largo tiempo hasta que las condiciones sean idóneas. Después las L4 migran al lumen abomasal, donde se diferencian sexualmente, dando lugar al nematodo adulto (L5) capaz de reproducirse, de 18-21 días después de la infección las hembras ovipositan (Aguilar-Caballero *et al.*, 2008) (Figura 5).

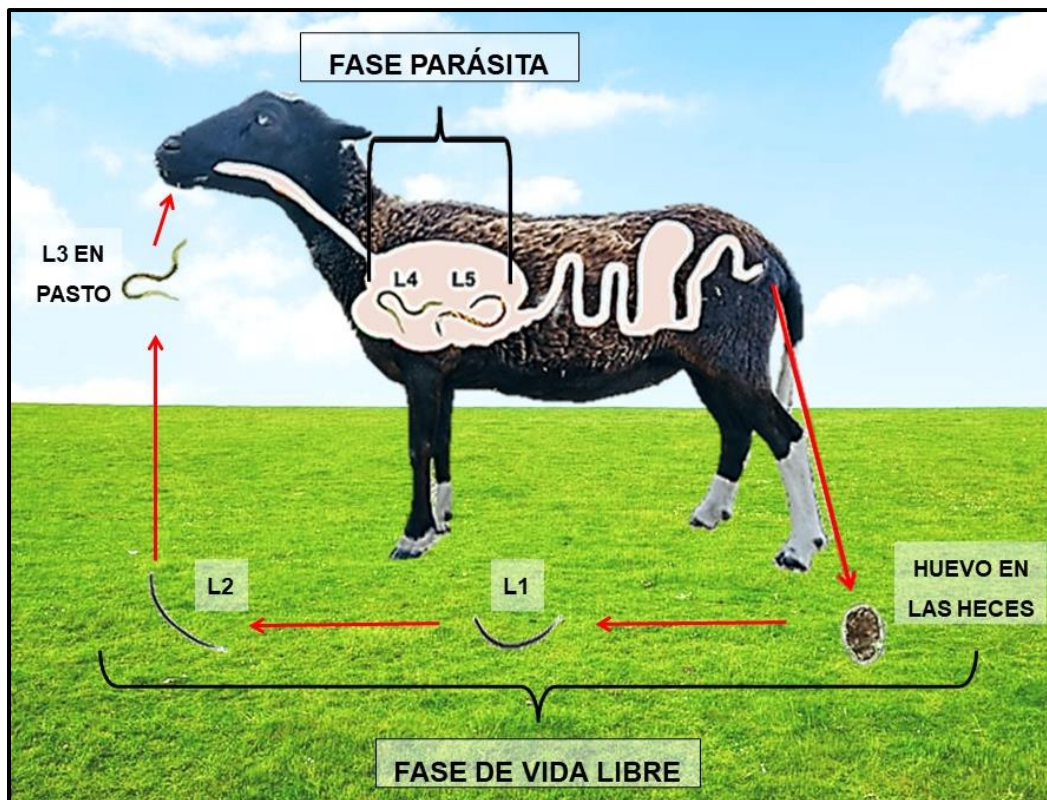


Figura 5. Ciclo biológico de *Haemonchus contortus*.

Fuente: Cortesía de Bautista-Garfías, 2021.

2.4 Control convencional

El control de NGI radica principalmente en el uso de antihelmínticos de amplio espectro, existen cinco grupos de nematicidas para uso en rumiantes: 1) benzimidazoles, 2) salicilanílicos, 3) nitrofenoles, 4) imidazotiazoles y 5) lactonas macrocíclicas, de estos

grupos, los más utilizados en la ovinocultura son los benzimidazoles, imidazotiazoles y lactonas macrocíclicas (Cuéllar, 2009) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Principales grupos de antihelmínticos, sus principios activos, dosis y vías de administración existentes en el mercado para uso en pequeños rumiantes.

GRUPO	PRINCIPIO ACTIVO	DOSIS (mg/kg)	VÍA DE ADMINISTRACIÓN
	Albendazol	5	Oral
	Fenbendazol	5	Oral
Benzimidazoles	Oxfendazol	5	Oral
	Sulfóxido de albendazol	3.75	Subcutánea
	Febantel	6	Oral
Probenzimidazoles	Tiofanato	50	Oral
	Netobimín	7.5	Oral
Imidazotiazoles	Levamisol	7.5	Subcutánea
	Ivermectina	0.2	Subcutánea y oral
Lactonas macrocíclicas	Moxidectina	0.2	Subcutánea
	Doramectina	0.2	Subcutánea
Nitrofenoles	Nitroxinil	10	Subcutánea
Salicilanilinas	Closantel	10	Subcutánea y oral

Fuente: Cuéllar, 2009.

El uso indiscriminado de estos tratamientos químicos ha desencadenado una resistencia a estos fármacos por las poblaciones de nematodos, lo que ha orillado a los productores al incremento de la frecuencia de los tratamientos, en especial con fármacos de actividad persistente, agravando así el problema de parasitismo, por efecto de la insostenibilidad económica y ambiental de esta práctica, provocando que haya mayor presencia de parasitismo en los animales, gastos extra e innecesarios para el productor, riesgo en la salud pública por los residuos de químicos en productos de origen animal, contaminación ambiental, afección a los organismos benéficos que degradan las heces (*e.g* escarabajos estercoleros, lombrices, ácaros nematófagos e insectos coprófagos); también se ha observado aumento de resistencia antihelmíntica, generando parásitos multirresistentes (Cuéllar, 2009; Márquez-Lara, 2014; Muchiut *et al.*, 2018).

2.5 Resistencia antihelmíntica

La resistencia antihelmíntica (RA) es la capacidad que tiene un helminto de tolerar concentraciones que prueban ser letales para los individuos de la misma especie (Cuéllar, 2009). Los NGI son difíciles de controlar por su alto grado de adaptación inmunológica, otro factor importante es el ecológico y la creciente resistencia de poblaciones parásitas a múltiples nematicidas (López y Mendoza, 2011).

La resistencia a los principios activos de los antihelmínticos es un proceso de adaptación de los parásitos, en el que el gen que les confiere la resistencia se encuentra con poca frecuencia en poblaciones de parásitos en una primera exposición a un antihelmíntico, posteriormente, con el uso constante, los parásitos resistentes empiezan a tener ventajas sobre los susceptibles, generando una presión de selección (Márquez-Lara, 2014).

Se ha notificado resistencia antihelmíntica en diferentes partes del mundo, señalando parásitos resistentes a diferentes principios activos e incluso parásitos multirresistentes (resistentes a dos o más principios activos), lo que significa que están molecularmente capacitados para resistir a cierto tipo de fármacos y eso es heredado de generación en

generación, esto ha ido en aumento principalmente en *H. contortus* debido a su potencial biótico (Pratt y Taylor, 1990; Herrera-Manzanilla *et al.*, 2017).

Por otra parte, algunos estudios han referido que *H. contortus* presenta resistencia antihelmíntica al levamisol, ivermectina, benzimidazol e incluso ha mostrado ser resistente a más de un fármaco en México (Medina *et al.*, 2014; Cazajous *et al.*, 2018). Se ha notificado presencia de resistencia antihelmíntica en Chiapas, Tabasco, Yucatán, Campeche, Tlaxcala, Puebla, Edo. México, Morelos y recientemente notificado en la Huasteca Potosina (González-Garduño *et al.*, 2014; Torres-Acosta *et al.*, 2015; Muñiz-Lagunes *et al.*, 2015; Alcalá-Canto *et al.*, 2016; Herrera-Manzanilla *et al.*, 2017; Santiago-Figueroa *et al.*, 2019).

2.6 Control no convencional

Como resultado de la resistencia antihelmíntica, investigadores se han dado a la tarea de buscar alternativas de control sostenible contra nematodos gastrointestinales que afectan a la ganadería. Se han implementado estrategias como manejo del pastoreo (rotación de potreros), inmunizaciones con larvas y vacunas, encastamiento con ganado resistente y uso de partículas de cobre; sin embargo, este último método ha sido limitado ya que no se observa mejoría en la ganancia de peso, además de que se han encontrado acumulaciones de cobre en el hígado, lo que podría ser peligroso para la salud de los animales (Aguilar-Caballero *et al.*, 2011).

Por otro lado, existen antagonistas naturales contra nematodos, entre ellos se encuentran, bacterias: *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis*, *Pasteuria penetrans*, *Serratia ureilytica* (Condemarin *et al.*, 2018; Ciancio, 2018; Méndez-Santiago, 2020; Wong-Villarreal *et al.*, 2021), protozoarios: *Nosema locustae* (Badii y Abreu, 2006), insectos: avispa *Trichogramma achaeae* y *T. cacoeciae* (Gallego *et al.*, 2020), virus: Baculovirus (Ayala y Henderson, 2017), nematodos depredadores de otros nematodos: *Butlerius butleri* (Aguilar-Marcelino *et al.*, 2020), ácaros nematófagos: *Caloglyphus mycophagus* (Aguilar-Marcelino *et al.*, 2017), plantas medicinales, de las cuales sus

principales compuestos son los terpenos, alcaloides, saponinas, atraquinonas y taninos (Medina *et al.*, 2014; Al-Ani *et al.*, 2020; Aguilar-Marcelino *et al.*, 2020) y hongos comestibles, los más estudiados han sido los hongos del género *Pleurotus* spp. (Rodríguez-Barrera *et al.*, 2021).

2.7 Hongos

Uno de los grandes recursos que existen en la naturaleza son los hongos, los micromicetos (microscópicos) que habitan de forma natural en el suelo (hongos nematófagos), tienen la capacidad de atrapar, matar y digerir nematodos en su fase de vida libre, y los macromicetos (macroscópicos), Comans-Pérez *et al.* (2020), mencionan que la actividad biológica de los hongos podría deberse a toxinas, que inhiben el movimiento de los nematodos; también realizaron una investigación de control biológico utilizando extracto hidroalcohólico de micelio donde tuvieron resultados variables de efectividad antihelmíntica, siendo los más efectivos: *P. ostreatus*, *P. eryngii* y *Lentinula edodes*.

Los basidiomicetos se han cultivado alrededor del mundo, tomando gran importancia desde miles de años atrás, en varias culturas del mundo y como parte de la medicina tradicional China (El Enshasy *et al.*, 2013), están incorporados en la dieta humana ya que poseen nutrientes esenciales como proteína, fibra, carbohidratos vitaminas y minerales, así como bajos niveles de colesterol grasa y sodio (Fernandes *et al.*, 2015), compuestos bioactivos (metabolitos secundarios) de diferentes grupos: polisacáridos, proteínas, fenólicos, y otros compuestos de bajo peso molecular.

Esos compuestos ya han sido estudiados y han demostrado tener propiedades medicinales efectivas como: antioxidantes, propiedades anticancerígenas, inmunomoduladores, antimicrobianos, antiinflamatorios, antitrombogénicos, hepatoprotectores, antihelmínticos, entre otros (Peraza-Padilla *et al.*, 2011; Sherma y Gautam, 2015; Wu *et al.*, 2016).

Se ha notificado que 55 especies de hongos comestibles tienen actividad nematocida, destacando los hongos del género *Pleurotus*, que poseen compuestos bioactivos como: proteasas, ácidos grasos, alcaloides, terpenos, taninos condensados y compuestos fenólicos y peptídicos obtenidos de hongos muestran actividad antiparasitaria de importancia agropecuaria y de salud pública (Sánchez y Royse, 2017; Castañeda-Ramírez *et al.*, 2020) (Figura 6).

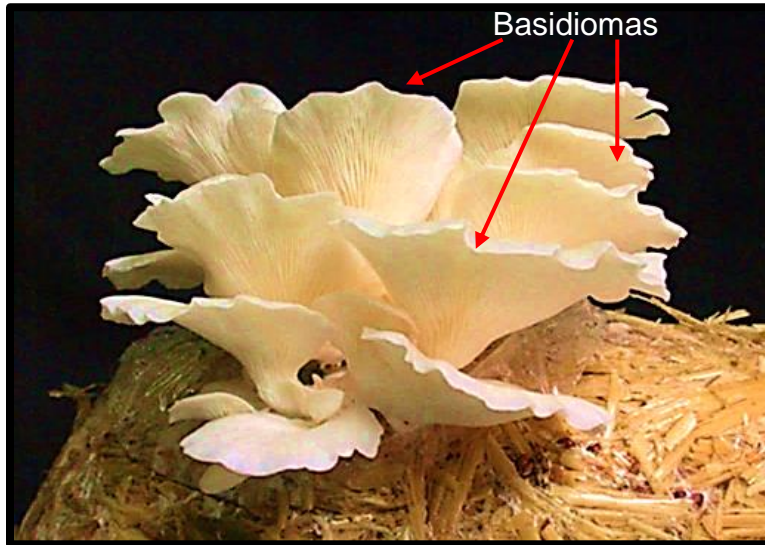


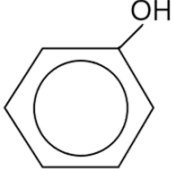
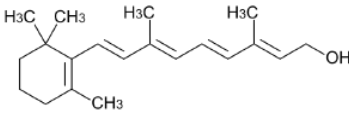
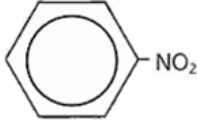
Figura 6. Basidiomas de *Pleurotus djamor*.

En la figura se señalan con flechas rojas los basidiomas cultivados en paja de cebada.
Fuente: Salmones, 2017.

2.7.1 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son compuestos químicos derivados del metabolismo primario de los hongos. Este tipo de metabolismo sintetizan metabolitos que son esenciales para el desarrollo del organismo, como: carbohidratos, lípidos, proteínas; los metabolitos secundarios no son esenciales; aunque, si juegan un papel importante como mecanismo de defensa mediada por conversiones enzimáticas que se activan ante una lesión en su estructura, como: fenoles, terpenos, taninos (Li y Zhang, 2014) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Grupos de metabolitos secundarios, descripción y estructura.

Metabolitos secundarios	Descripción	Estructura
Fenoles	<p>Son compuestos aromáticos, poseen uno o más grupos hidroxilo; la mayor parte son compuestos polifenólicos, se pueden encontrar en basidiomas de hongos.</p> <p>Compuestos polifenólicos como: Taninos, Flavonoides, (Olivas-Aguirre <i>et al.</i>, 2015; Sierra-Sarmiento <i>et al.</i>, 2018).</p>	
Terpenoides o isoprenoides	<p>Son compuestos volátiles con más de 40,000 moléculas diferentes, tienen propiedades aromáticas. Se encuentran principalmente en plantas en forma de aceites esenciales y saponinas.</p> <p>Actúan como precursores en la síntesis de esteroides. (Viteri, 2012; Vélez-Terranova <i>et al.</i>, 2014; Sierra-Sarmiento <i>et al.</i>, 2018).</p>	
Nitrogenados	<p>Son alcaloides y glucósidos cianogénicos, se consideran como los de mayor relación en la defensa, formados principalmente por aminoácidos.</p> <p>Poseen uno o más átomos de Nitrógeno, lo que da lugar a la formación de un heterociclo (Pérez y Jiménez, 2010).</p>	 <p data-bbox="1154 1556 1300 1583">Nitrobenceno</p>

Fuente: Cuadro realizado con información obtenida de: Pérez y Jiménez, 2010; Viteri, 2012; Vélez-Terranova *et al.*, 2014; Olivas-Aguirre *et al.*, 2015; Sierra-Sarmiento *et al.*, 2018; Sierra-Sarmiento *et al.*, 2018.

Dentro de los isoprenoides se encuentran los aceites esenciales, que son productos volátiles, en su mayoría poseen aroma agradable, son generalmente líquidos a temperatura ambiente, insolubles en medios acuosos y solubles en solventes orgánicos apolares, son incoloros o amarillos, lipófilos, poseen un índice de refracción elevado y poder rotatorio quiral (Ruiz *et al.*, 2015).

Los aceites esenciales o ácidos grasos provienen de diferentes recursos vegetales (tallos, hojas, frutos, raíces, cortezas, etc.), tienen propiedades biológicas que han sido utilizadas la industria, alimentaria, cosmética y farmacológica por mencionar algunos y pueden ser exploradas en el ámbito veterinario y crear un impacto favorable, por ejemplo, en el control de nematodos gastrointestinales (Torres-Fajardo e Higuera-Piedrahita, 2021).

Desde hace más de 30 años se ha notificado que los hongos comestibles del género *Pleurotus* poseen ácidos grasos con actividad nematocida (Kwok *et al.*, 1992; Stadler *et al.*, 1993). En 2017 se notificaron cuatro ácidos grasos (pentadecanoico, palmítico, esteárico, linoleico) y un terpeno identificado como β -sitosterol en una fracción metanólica bioactiva obtenida del hongo comestible *P. djamor* (Pineda-Alegía *et al.*, 2017). Más adelante, en 2020, se evaluó la actividad nematocida de los cuatro ácidos grasos y el terpeno (comerciales), en la fase de huevos y larvas infectantes (L3) de *H. contortus* (Pineda-Alegría *et al.*, 2020).

2.7.2 Metabolitos secundarios contra *H. contortus*

Se han aislado metabolitos secundarios obtenidos de basidiomas del género *Pleurotus*, los cuales han mostrado propiedades nutracéuticas y nematocidas (Sánchez y Royse, 2017). Los metabolitos secundarios notificados contra *H. contortus* en sus diferentes estadios se describen en el cuadro 3.

Cuadro 3. Diferentes especies del género *Pleurotus*, notificados con actividad nematocida contra *H. contortus*.

Especie de hongo	Estadio de <i>H. contortus</i>	Molécula bioactiva
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Huevos y larvas (L3)	Xylitol, ácido hexadecanoico, ácido octadecanoico, 2-butoxy fosfato etanol, 2-butoxy fosfato etanol (3:1) y un xylitol azúcar.
<i>Pleurotus djamor</i>	Huevos y larvas (L3)	Fracción E1: (i) pentadecanoico, (ii) hexadecanoico, (iii) octadecadienoico, (iv) ácido octadecanoico y un terpeno identificado como β -sitosterol.
<i>Pleurotus eryngii</i>	Huevos y larvas (L3)	Fracción E5: trehalosa, polyoles (L-identol, galactitol, D-manitol, D-glucitol y myoinositol), ácido adipíco, ácido esteárico, escualeno y β -sitosterol.
<i>Pleurotus djamor</i>	Huevos y larvas (L3)	Ácido pentadecanoico, ácido palmítico, β -sitosterol, ácido esteárico y ácido linoleico.
<i>Pleurotus djamor</i>	Huevos y larvas (L3 y L4)	Fracción PdB: Allitol y un terpeno no identificado (9:1).

Fuente: Modificado de Castañeda-Ramírez *et al.*, 2020.

2.7.3 Mantenimiento de lavas infectantes (L3), histiotróficas (L4) y adultos de *H. contortus*

Varios autores como Hounzangbe-Adote *et al.* (2005), Alimi *et al.* (2018), Adamu *et al.* (2019), Taki *et al.* (2020) han descrito diversos medios y condiciones para la realización de pruebas *in vitro* con *H. contortus* en sus diferentes estadios evolutivos en otros países y en México por Acevedo-Ramírez *et al.*, (2019) Cuadro 4).

Cuadro 4. Procedimientos *in vitro* con metabolitos secundarios, en diferentes estadios de *H. contortus*.

Medio de mantenimiento	Estadio	Dióxido de carbono (%)	Temp. (°C)	Humedad (%)	Lectura (h)	Obx
RPMI 1640 sin rojo fenol, con L-glutamina 2mM, Penicilina 100 U/mL, Estreptomina 100 µg/mL y Anfotericina-B 0.25 µg/mL (Taki <i>et al.</i> , 2020).	Adultos	10	40	>90	6 y 48	Grabación de video para observar motilidad
Compuestos disueltos en DMSO (stock 20mM), diluídos en caldo de Luria Bertani (LB) supl. Penicilina 100 U/mL, Estreptomina 100 µg/mL y Anfotericina-B 0.25 µg/mL (Taki <i>et al.</i> , 2020).	L3 exfol. (xL3)	10	38	>90	72	
PBS + Penicilina/Estreptomina 4%. Con cambio de sobrenadante c/24 h (Hounzangbe-Adote <i>et al.</i> , 2005).	Adultos	5	37	-	3, 6 y 12	
PBS (Adamu <i>et al.</i> , 2019)	Adultos	N/A	20	-	3	
Abomaso infectado en NaCl al 9% a 37° y PBS (Alimi <i>et al.</i> , 2018).	Adultos	N/A	37	-	0, 2, 4, 6 y 8	
Solución salina a 4°C, almacenamiento por 15 días (Acevedo-Ramírez <i>et al.</i> , 2019).	Adultos	5	37	-	0.5, 1, 2 y 24	

Fuente: Realizado por la autora del presente trabajo con la información de Hounzangbe-Adote *et al.*, 2005, Alimi *et al.*, 2018, Adamu *et al.*, 2019 y Taki *et al.*, 2020.

III. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad existe una amplia variedad de productos químicos para controlar el parasitismo, en animales, plantas y humanos. Sin embargo, en el área agrícola y pecuaria no se tiene un control con el uso de estos productos, ya que se utilizan de manera indiscriminada, a diestra y siniestra, provocando desarrollo de resistencia a los principios activos.

La producción de pequeños rumiantes se ve afectada por diversos parásitos, entre ellos los NGI, que se ha notificado presencia de resistencia antihelmíntica a los principios activos existentes en todo el mundo. Por otro lado, no solo existe el problema de RA, sino también la residualidad de estos químicos, se ha notificado residuos en carne y leche de animales tratados con ivermectina, productos que tienen como destino el consumo humano.

En contraparte, existe ecotoxicidad, al ser desechado por heces y orina, siendo consecuencia de efectos letales en organismos no blanco, afectando a la coprofauna y alentando la degradación de la materia orgánica, modifica la superficie del suelo y si las heces u orina se desechan cerca de mantos acuíferos afecta a los organismos acuáticos.

Debido a lo antes mencionado es que surge la necesidad de encontrar productos naturales que posean actividad nematocida, como los hongos comestibles, de los cuales han notificado metabolitos secundarios con diversas propiedades.

Este estudio se basa en la evaluación de dos compuestos obtenidos a partir del hongo comestible *P. djamor*, una fracción semipurificada y el ácido linoleico, los cuales han mostrado actividad nematocida en *H. contortus* en estadios larvarios; sin embargo, es indispensable conocer la actividad en todos los estadios para posteriormente extrapolarlo a experimentos *in vivo*.

IV. HIPÓTESIS

La fracción PdR-2 del hongo comestible *P. djamor* posee actividad nematocida *in vitro* en adultos y larvas infectantes (L3) con vaina de *H. contortus*; del mismo modo, el ácido linoleico comercial posee efectividad nematocida *in vitro* en adultos de *H. contortus*

V. OBJETIVOS

5.1 General

- 5.1.1 Evaluar la efectividad nematicida *in vitro* de la fracción PdR-2 del hongo comestible *P. djamor* y ácido linoleico comercial en larvas infectantes y adultos de *H. contortus*.

5.2 Específicos

- 5.2.1 Determinar la efectividad nematicida *in vitro* la fracción PdR-2 del hongo comestible *P. djamor* en larvas infectantes (L3) con vaina y adultos de *H. contortus*.
- 5.2.2 Estimar la efectividad nematicida *in vitro* del ácido linoleico comercial en adultos de *H. contortus*.
- 5.2.3 Cuantificar las alteraciones morfométricas de epicutícula de *H. contortus* adultos inducidas por la incubación con ácido linoleico por medio de secciones histológicas.
- 5.2.4 Describir cambios morfológicos a nivel ultraestructural en el tegumento de adultos de *H. contortus* incubados con ácido linoleico comercial.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Localización

La investigación se realizó en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Sanidad Animal e Inocuidad (CENID-SAI), del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Jiutepec, Morelos, México y en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), Cuernavaca, Morelos (Figura 7).



Figura 7. Instituciones involucradas en el desarrollo del presente trabajo.

7A. CENID-SAI, INIFAP. 7B. Facultad de Ciencias Agropecuarias (UAEM).

6.2 Diagrama de proceso experimental

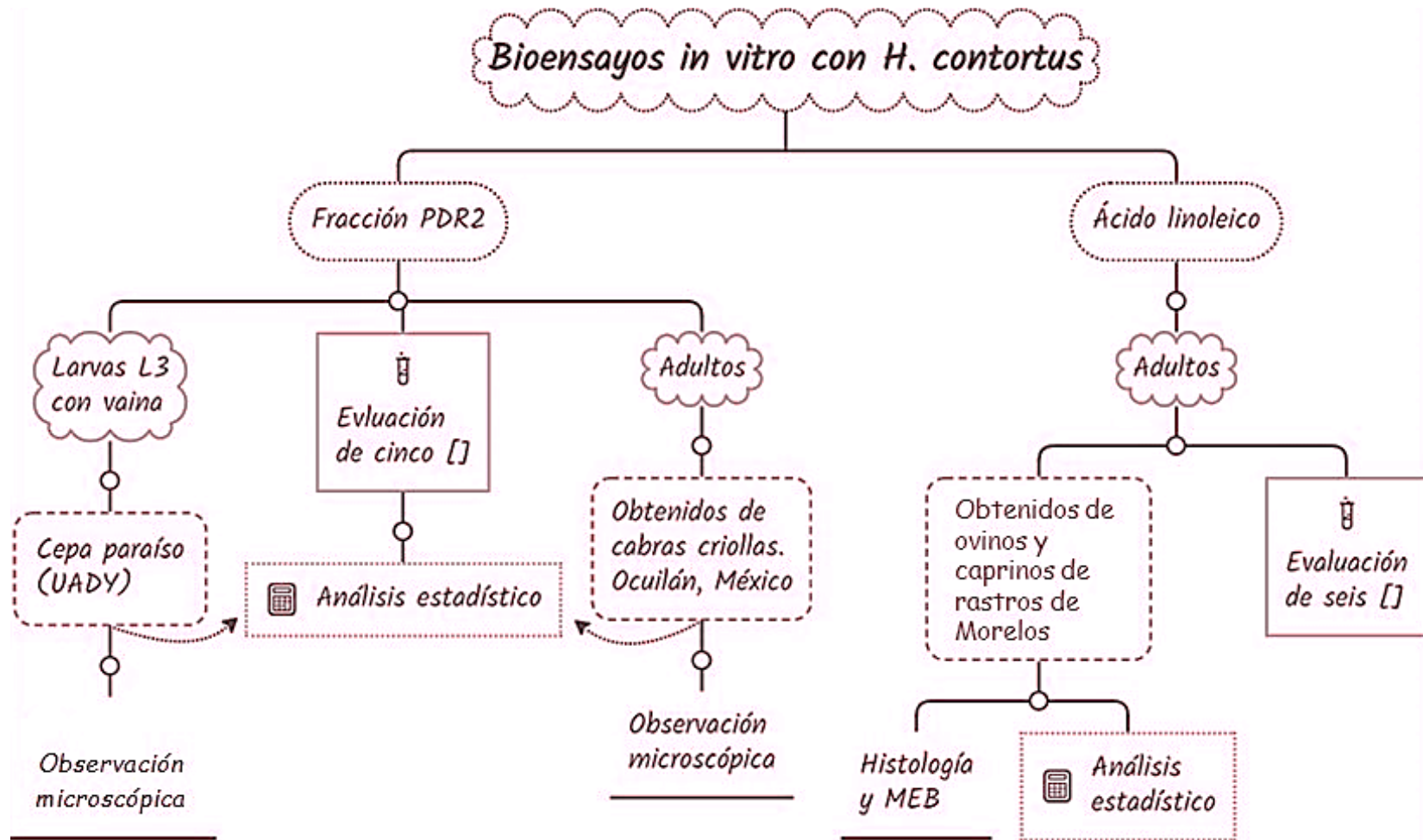


Figura 8. Diagrama del proceso experimental.

Fuente: Pérez-Montero, 2020.

6.3 Obtención de material biológico

6.3.1 *Haemonchus contortus*

6.3.1.1 Larvas infectantes (L3)

Las larvas infectantes (L3) de *H. contortus* corresponden a la cepa Paraíso, proporcionada por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY), Yucatán, México. Las cuales se obtuvieron por la técnica descrita por Castañeda-Ramírez *et al.* (2017); recolección de sedimentos fecales de ovinos, lavado con agua corriente e incubación en cajas de Petri a 28°C durante 5 días, posteriormente colocadas en embudo de Baermann para la obtención de larvas infectantes y finalmente almacenamiento a 4°C.

6.3.1.2 Adultos para bioensayo de la fracción PdR-2

Se obtuvieron de la siguiente localización:

Lugar: Barrio de Santa Mónica, Ocuilán, Estado de México.

Coordenadas en Google Maps: 18°59'22.9"N 99°25'10.6"W (Figura 9).



Figura 9. Ubicación de rastro para recolección de adultos de *Haemonchus contortus*.

Fuente: Tomada de Google Maps, 2021.

Se encuentra a 2360 msnm, con clima templado y subhúmedo, su temperatura media anual es de 15.5°C y la precipitación pluvial promedio es de 402 mm.

6.3.1.3 Adultos utilizados en pruebas *in vitro* con ácido linoleico

Se obtuvieron de animales provenientes de diferentes municipios del Estado de Morelos:

1. Tres Marías, Huitzilac.
2. Amayuca, Jantetelco.
3. Jonacatepec.
4. Temoac
5. Iztaccíhuatl, Cuautla.
6. Temoac.

Los parásitos adultos de *H. contortus* que se utilizaron en el experimento *in vitro* con la fracción PdR-2 se recuperaron de abomasos de cabras criollas (*Capra aegagrus hircus*) y los adultos utilizados en los bioensayos con ácido linoleico se obtuvieron de ovinos y cabras criollas (*Ovis aries* y *Capra aegagrus hircus*). Tanto cabras como ovinos fueron sacrificados para consumo humano (la autora de este trabajo no intervino en la matanza).

Se llevó a cabo el examen de abomasos individualmente y se extrajeron los adultos de *H. contortus* encontrados (Apéndice 1), los cuales fueron colocados en cajas Petri con solución amortiguadora de fosfatos (PBS pH: 7.4) con una temperatura de 35 a 38°C para ser transportados al laboratorio (Figura 10).

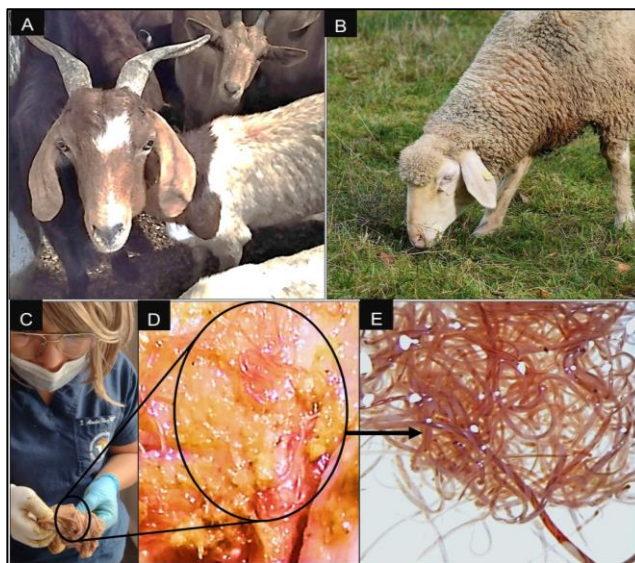


Figura 10. Representación del proceso de colecta de adultos de cabras infectadas.

Fuente: Pérez-Montero, 2021.

- A. Cabra criolla proveniente de Santa Mónica Oculán. B. Oveja proveniente de Tres Marías. C. Localización de adultos en abomaso. D. Adultos de *H. contortus* colocados en placa de Petri con PBS pH: 7.4.

6.3.2 Fracción bioactiva PdR-2

Fue proporcionada por el CENID-SAI, INIFAP, donde se encontraba resguardada, liofilizada y en condiciones óptimas (-20°C) (González-Cortázar *et al.*, 2020).

Para su obtención, se utilizaron basidiomas de *P. djamor* ECS-0127 del Laboratorio de Hongos Tropicales del Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR, Unidad Tapachula, Chiapas, México) con la colaboración del Dr. José Ernesto Sánchez Vázquez.

Posteriormente se obtuvo el extracto hidroalcohólico de basidiomas, fraccionamiento químico biodirigido conforme a la técnica descrita por González-Cortázar *et al.* (2020), donde reportaron la obtención la fracción semipurificada PdR-2 y la fracción purificada PdB, las cuales fueron enviadas a Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas, registrando Allitol y un terpeno no identificado en una proporción 9:1 respectivamente.

6.3.3 Ácido linoleico comercial

Ácido octadecanoico (linoleico) comercial marca SIGMA-ALDRICH, ≥90%, fórmula lineal: CH₃(CH₂CH=CH)₃(CH₂)₇CO₂H.

6.4 Pruebas *in vitro*

Evaluación *in vitro* de la fracción PdR-2 del hongo comestible *P. djamor* en larvas infectantes (L3) con vaina de *H. contortus*

Se realizaron cinco diferentes concentraciones de la fracción PdR-2 (80, 60, 40, 20, 10 mg/mL) diluidas en PBS, pH: 7.4 más dos tratamientos control (PBS, pH. 7.4 como control negativo e Ivermectina (IVM) 5 mg/mL como control positivo) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Tratamientos y concentraciones utilizadas en la prueba *in vitro* de larvas infectantes (L3) con vaina y fracción PdR-2 a partir de 80 mg/mL.

Tratamiento Fracción PdR-2	Concentración (mg/mL)
1	80
2	60
3	40
4	20
5	10
Controles	PBS pH: 7.4
	IVM 5 mg/mL
Tiempo de lectura: 72 h.	
n= 3	

Se colocaron en una placa de 96 pozos, 80 µL de cada concentración y controles y 20 µL de suspensión con larvas (aproximadamente 100 larvas por pozo), con tres repeticiones por grupo, se incubaron a 28°C durante 72 h, posteriormente se realizaron lecturas postconfrontación tomando 10 alícuotas de 10 µL de cada tratamiento colocado en un portaobjetos bajo microscopio óptico a 40x (Apéndice 2).

6.4.1 Evaluación *in vitro* de la fracción PdR-2 del hongo comestible *P. djamor* en adultos de *H. contortus*

La evaluación *in vitro* de la fracción PdR-2 de *P. djamor* contra adultos de *H. contortus* se llevó a cabo en cajas de Petri de 5 mL, cada caja se consideró como una unidad experimental (Apéndice 3). Se realizaron nueve tratamientos con una n=10 adultos por

cada unidad experimental (5 hembras y 5 machos), con tres repeticiones cada concentración, se utilizó la molécula sintética Allitol grado analítico a 2.5 mg/mL, cinco concentraciones de la fracción PdR-2: 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 mg/mL, dos grupos testigo (medio RPMI como control negativo e ivermectina (IVM) 0.1 mg/mL como control positivo) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Tratamientos y concentraciones utilizadas en el bioensayo de adultos de *H. contortus* y fracción PdR-2 a partir de 5 mg/mL.

Tratamiento	Concentración (mg/mL)	
Allitol	1	2.5
	2	5
	3	2.5
Fracción PdR-2	4	1.25
	5	0.625
	6	0.312
	7	100%
Controles	8	0.1 mg/mL

Tiempo de lectura: 1 h y 18 h. n=3

Las cajas de Petri se incubaron a 37°C, con 5% de CO₂ se utilizó un total de 240 adultos para este experimento. La mortalidad se evaluó a la hora y 18 h bajo un microscopio estereoscópico 10x.

6.4.2 Evaluación *in vitro* de ácido linoleico comercial en adultos de *H. contortus*

Se utilizaron cuatro concentraciones de ácido linoleico (5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156 g/mL) diluidos en DMSO 0.1%, un control positivo con ivermectina al 0.1% y un control negativo con el diluyente (DMSO 0.1%), (Apéndice 4), (Cuadro 7)

Cuadro 7. Tratamientos y concentraciones utilizadas en la prueba *in vitro* de adultos de *H. contortus* contra el ácido linoleico comercial a partir de 5 mg/mL.

Tratamiento Ácido linoleico	Concentración (mg/mL)
1	5
2	2.5
3	1.25
4	0.625
5	0.312
6	0.156
Controles	DMSO 0.1%
	IVM 0.1 mg/mL

Tiempo de lectura: 5 C/10 min. n= 4

Los tratamientos se realizaron en placas de 6 pozos (1 placa por tratamiento), cada pozo fue considerado una unidad experimental y en cada uno se colocaron de 12 adultos con un volumen final de 3 mL de cada tratamiento. Se incubaron a 37° C y se realizaron cinco lecturas con intervalo de 10 minutos entre ellas.

6.4.3 Preparación de muestras histológicas para la determinación de las alteraciones morfológicas en adultos de *H. contortus* postconfrontación con el ácido linoleico

Se seleccionó el tratamiento con ácido linoleico a una concentración de 5 mg/mL y dos controles (negativo con DMSO 0.1% y positivo con IVM 0.1%), se colocaron cinco adultos en paraformaldehído al 4% a 4°C durante al menos 24h separados por tratamiento, posteriormente se realizaron deshidrataciones progresivas con alcohol a partir de 70% hasta 100%, después alcohol-xilol (50:50) y xilol 100%, enseguida se incluyeron en parafina. Posteriormente se colocan en moldes de plástico, se colocan en solución de hidróxido de potasio al 10% y se inicia con los cortes transversales de 5 µm de grosor con microtomo de deslizamiento con cuchillas de bajo perfil.

Los cortes se colocaron en xilol 100% y luego en alcohol a partir de 100% hasta 70% para rehidratar, se lavó con agua y se sumergió en hematoxilina por 10 minutos, se lavó con agua y se pasó rápidamente por alcohol ácido, se lavó con agua y se colocó 30 segundos en eosina. Se realizó deshidratación progresiva con alcohol a partir de 70% hasta 100%, se colocó en xilol y se realizó montaje final para observación al microscopio óptico a 10x y 40x.

6.4.4 Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido para la determinación de las alteraciones morfológicas en adultos de *H. contortus* postconfrontación con el ácido linoleico

Se seleccionó el tratamiento con ácido linoleico a una concentración de 5 mg/mL y dos controles (negativo con DMSO 0.1% y positivo con IVM 0.1%), se colocaron 10 especímenes por tratamiento en buffer de cacodilato para lavado y posteriormente en solución fijadora de KARNOVSKY modificada durante 12 h, posteriormente se realizaron

deshidrataciones ascendentes en alcohol a partir de 30% hasta 90% con duración de 25 min en cada solución y se dejaron los especímenes en solución de alcohol al 90% y se rotularon y enviaron a procesamiento de microscopía electrónica de barrido (MEB) al Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) Unidad de Microscopía Electrónica, Tapachula, Chiapas, México.

6.5 Análisis estadístico

Se obtuvo el número promedio de hembras y machos de *H. contortus* (larvas y adultos), de cada experimento y para cada grupo, se estimó el porcentaje de mortalidad de la población de larvas y adultos con respecto al grupo control mediante la fórmula de Abbott corregida (Rosenheim y Hoy, 1989):

$$= \frac{\bar{\chi} \text{ grupo tratado} - \bar{\chi} \text{ grupo control}}{100 - \bar{\chi} \text{ grupo control}} \times 100$$

(González-Cortázar *et al.*, 2020).

Posteriormente se realizaron análisis de varianza (ANOVA) con los resultados obtenidos en cada experimento a 1 h post confrontación para adultos con la fracción PdR-2, 72 h para larvas infectantes (L3) con vaina (PdR-2) y 50 minutos para adultos confrontados con ácido linoleico, adicionalmente se realizaron pruebas Tukey con $p=0.05$ para una comparación de medias entre tratamientos, todo realizado con el software "R" commander.

VII. RESULTADOS

7.1 Evaluación *in vitro* de la fracción PdR-2 del hongo comestible *P. djamor* en larvas infectantes (L3) con vaina de *H. contortus*

Los resultados obtenidos en el experimento realizado con larvas infectantes (L3) con vaina de *H. contortus*, arrojó los siguientes porcentajes de mortalidad: 100% con 80 mg/mL, 87.5% con 60 mg/mL, 62.8% con 40 mg/mL, 53.5% con 20mg/mL y 6.10% con 10 mg/mL. Se puede determinar que, a mayor concentración, mayor el porcentaje de mortalidad (Figura 11).

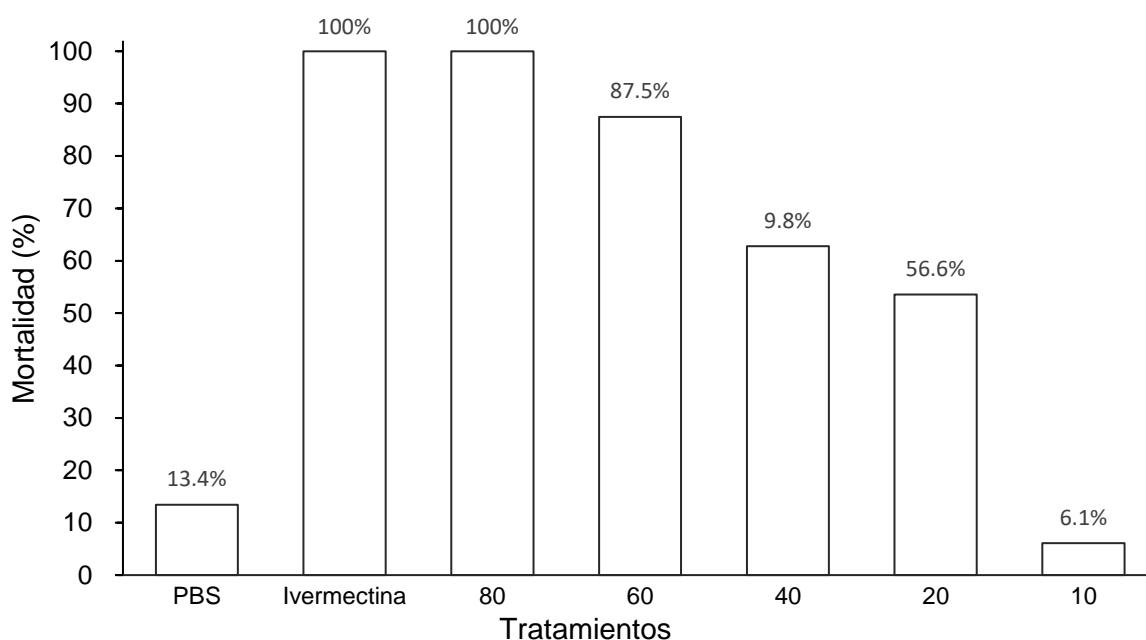


Figura 11. Resultados del porcentaje de efectividad nematicida obtenido en la evaluación *in vitro* de la fracción PdR-2 de *P. djamor* contra larvas infectantes (L3) con vaina de *Haemonchus contortus*.

7.2 Evaluación *in vitro* de la fracción PdR-2 del hongo comestible *P. djamor* en adultos de *H. contortus*

Con base en la evaluación *in vitro* la fracción PdR-2 del hongo comestible *P. djamor* contra adultos de *H. contortus* obtenidos de cabras infectadas naturalmente, los

resultados de mortalidad después de una hora mostraron bajos porcentajes en las concentraciones más diluidas (27.46% a 0.3125 mg/mL y 22.26% a 0.625 mg/mL), incluso se obtuvo un 8.39% en el grupo testigo negativo (RPMI), porcentaje elevado en comparación con la molécula sintética (Allitol) grado analítico y las concentraciones de 5 a 1.25 mg/mL de las fracción PdR-2, ya que sus porcentajes de mortalidad a la hora fueron igual a 0%, resultado contrario al esperado (Figura 12).

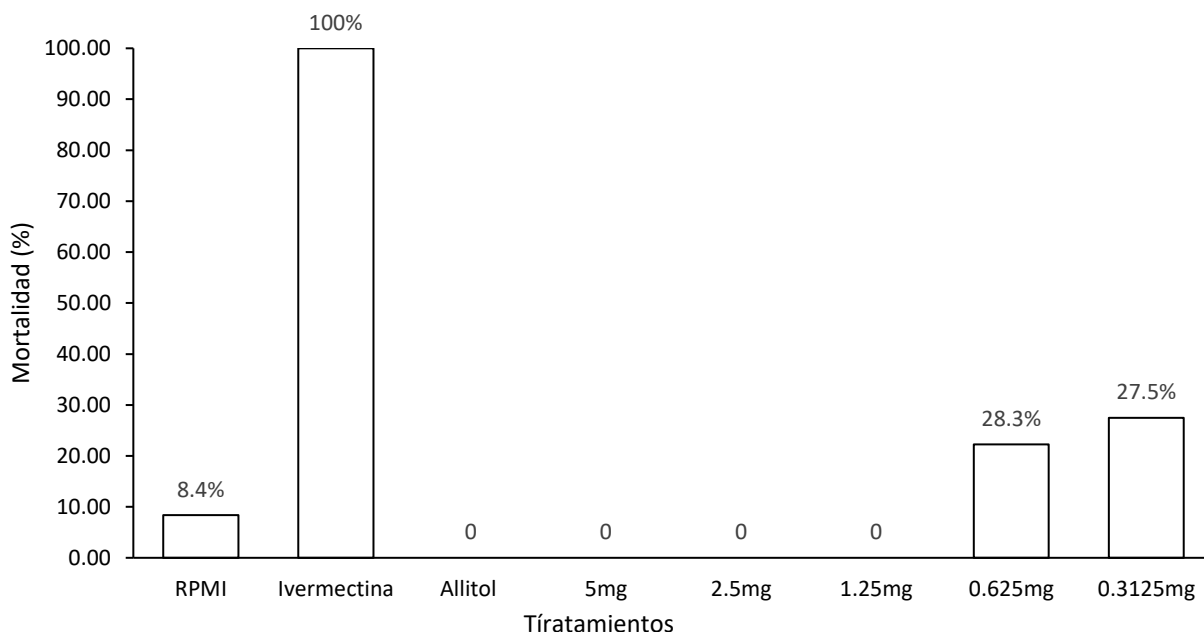


Figura 12. Porcentajes de mortalidad obtenidos en las pruebas *in vitro* de la fracción PdR-2 en adultos de *H. contortus* a la hora de incubación.

A las 18 h postconfrontación no fueron satisfactorios ni comparables los resultados obtenidos, debido a que en el grupo testigo negativo (RPMI) se obtuvo un porcentaje de mortalidad del 90%, así como 100% en las concentraciones de 2.5 a 1.25 mg/mL, 63.3% a 5 mg/mL y 25% con el Allitol (datos no mostrados), además, las desviaciones estándar obtenidas fueron muy elevadas, representando una mayor dispersión de datos en los tratamientos, en cuanto a la comparación de medias, no fueron significativas estadísticamente, por lo que únicamente se tomaron en cuenta los resultados obtenidos a la hora de incubación.

Se realizó observación mediante un microscopio óptico posterior a las 18 h de incubación y no se apreciaron alteraciones en los adultos expuestos a la fracción PdR-2, ni crecimiento de hifas como en el caso de larvas infectantes (L3) con vaina (Figura13).

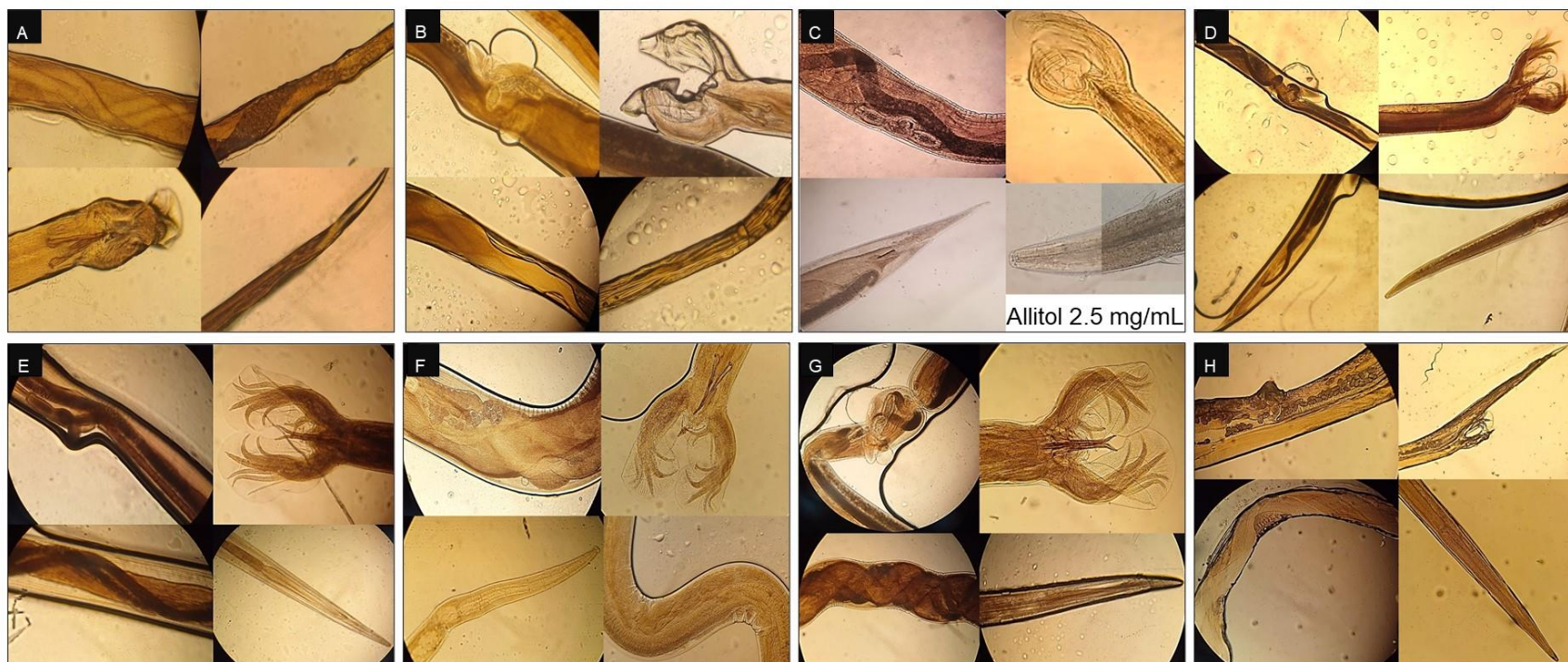


Figura 13. Fotografías de adultos de *H. contortus* de cada tratamiento, observado al microscopio óptico 10x.

13A. T1: Medio, se puede observar intestino y ovarios de la hembra de un color cristalino y en macho bursa cerrada, morfología sin alteraciones, 13B. T2: Ivermectina, se observa deshidratación del tegumento, principalmente en extremidades. 13C. T3: Allitol (2.5 mg/mL), se observaron vivos los especímenes examinados al microscopio sin alteraciones aparentes, mostraron contracciones intestinales y movimiento de bursa y espículas en macho y parte anterior en hembra. 13D. T4: Fracción PdR-2 a 5 mg/mL, un aspecto muy peculiar que mostró este tratamiento fue una coloración marrón en los nematodos (sus órganos se oscurecieron), la vulva en la hembra no mostro contracción, se notaba con abertura y no se observaron cambios en la bursa ni espículas del macho. 13E. T5: Fracción PdR-2 a 2.5 mg/mL, Las espículas del macho y vulva en la hembra sin alteraciones, la vesícula cefálica se observó más prominente. 13F. T6: Fracción PdR-2 a 1.25 mg/mL, la hembra mostró una contracción de intestino, el esófago del macho se notaba contraído en una porción. 13G. T7: Fracción PdR-2 a 0.625 mg/mL, La vulva de la hembra se observó cerrada, los ovarios e intestino se observaron relajados, sin contracción, la bursa y espículas del macho se apreciaron sin cambios aparentes. 13H. T8: Fracción PdR-2 a 0.312 mg/mL, no se observó contracción de órganos y se pueden apreciar los huevos listos para ser ovipositados; sin embargo, la vulva de la hembra sin cambios aparentes y la coloración marrón no fue tan prominente como en los tratamientos de mayor concentración de fracción.

7.3 Evaluación *in vitro* de ácido linoleico comercial en adultos de *H. contortus*

Se tomaron porcentajes de mortalidad hasta los 50 minutos de lectura que fue cuando la concentración más alta (5 mg/mL) obtuvo el 75% de mortalidad seguido de las concentraciones descendentes, dando como resultado un efecto dosis respuesta (Cuadro 8).

Cuadro 8. Mortalidad de adultos de *H. contortus* causado por el ácido linoleico comercial 30 minutos después de la exposición.

Tratamiento	Concentración (mg/mL)	Mortalidad \pm SD
Ácido linoleico	5	75 \pm 7.99 ^b
	2.5	43.75 \pm 4.79 ^c
	1.25	25.02 \pm 7.99 ^d
	0.625	8.87 \pm 7.09 ^{ef}
	0.3125	1.57 \pm 3.15 ^f
	0.15625	0.00 \pm 0.00 ^e
DMSO	0.1%	1.50 \pm 3.10 ^e
IVM	0.1%	100 \pm 0.00 ^a

Se obtuvo un análisis probit con la concentración Letal 50 y 90 del ácido linoleico comercial (Cuadro 9).

Cuadro 9. Concentración letal 50 y concentración letal 90 de ácido linoleico en adultos de *H. contortus*.

Tratamiento	CL ₅₀ (mg/mL)	Límite inferior	Límite superior	CL ₉₀ (mg/mL)	Límite inferior	Límite superior
Ácido linoleico	1.24	0.95	1.55	8.18	3.77	12.60

7.4 Alteraciones morfológicas en adultos de *H. contortus* postconfrontación con el ácido linoleico mediante histología

En la histoarquitectura de *H. contortus* fase adulta de los diferentes tratamientos utilizados (dos grupos testigo y ácido linoleico comercial 5 mg/mL), se observaron diferencias estructurales de membrana en la concentración con mayor efectividad antihelmíntica (5 mg/mL) a los 50 min de exposición (Figura 14).

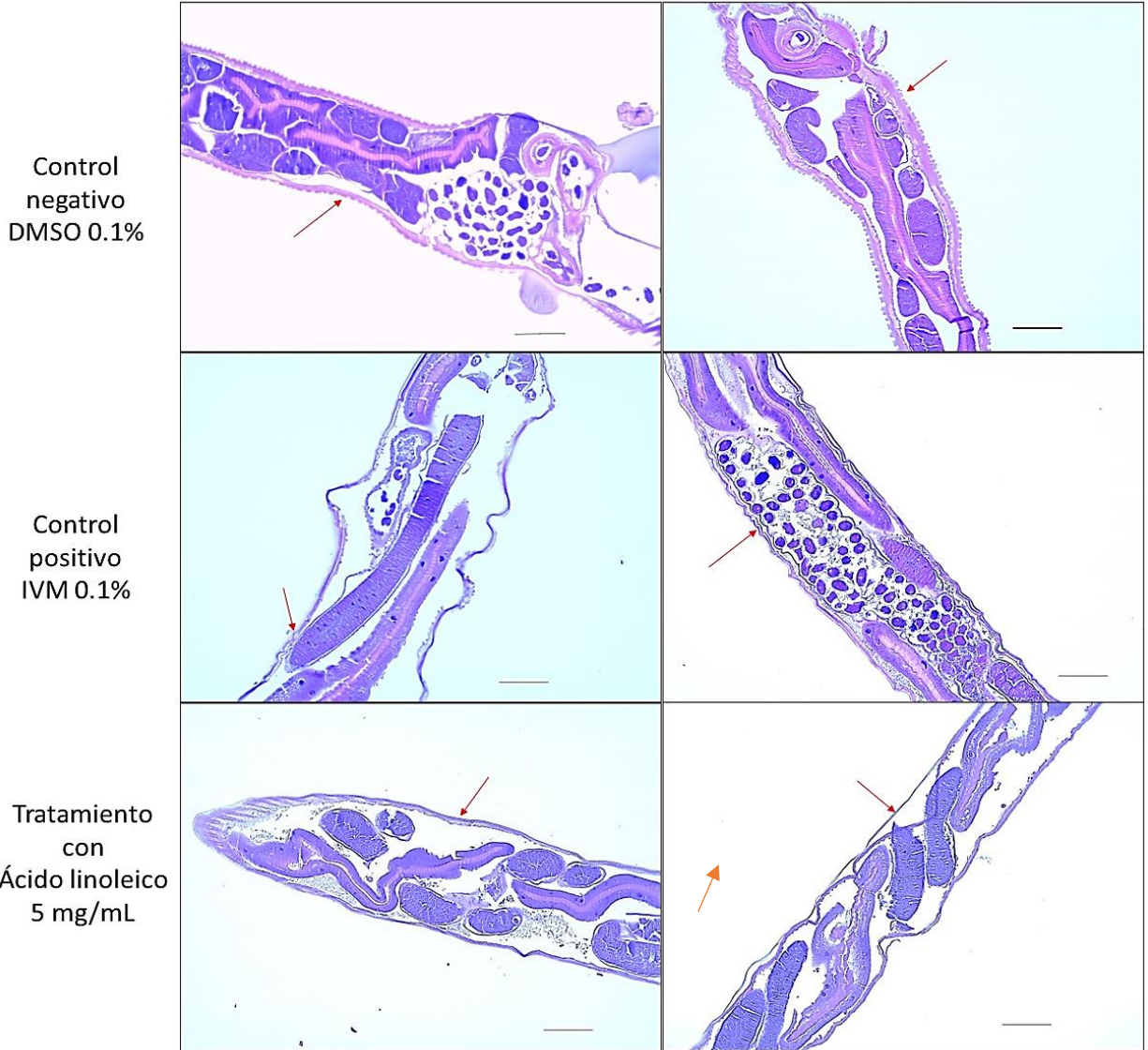


Figura 14. Cortes histológicos con tinción de hematoxilina y eosina de nematodos adultos de *H. contortus* incubados con ácido linoleico a 5 mg/mL y dos grupos testigo (DMSO 0.1% e IVM 0.1%). Las flechas rojas, indican la epicutícula del nematodo. Barra de escala de 100 μ m.

Se tomaron mediciones de la cutícula de los nematodos, abarcando la envoltura externa, hipodermis y musculatura. Se realizaron 10 medidas de cada toma fotográfica de las tres porciones del nematodo (anterior, media y posterior); de cada tratamiento, (ácido linoleico y los dos grupos testigos) en objetivo 40x. Se obtuvieron 360 mediciones en total (Figura 15).

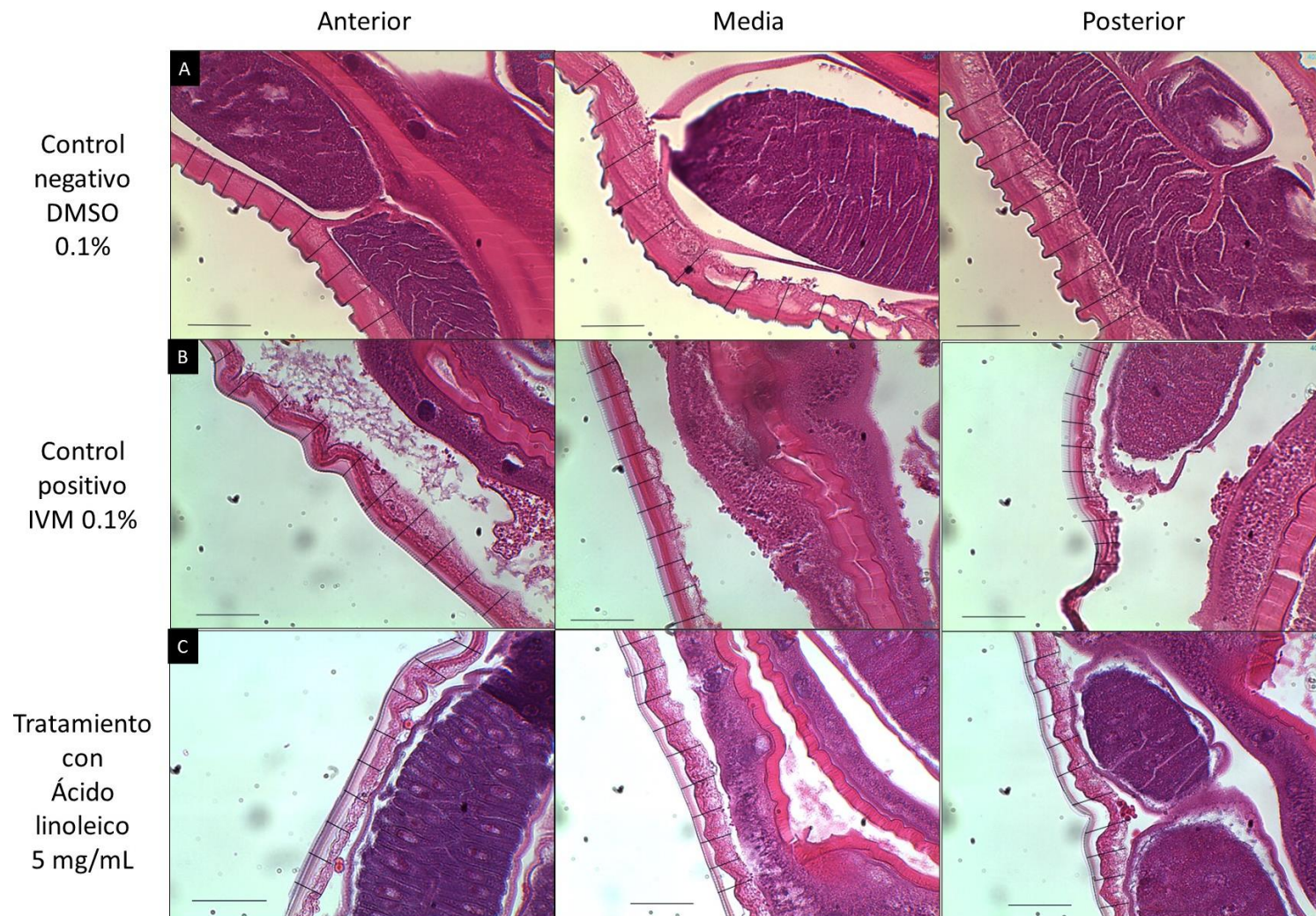


Figura 15. Cortes histológicos de adultos de *H. controtus*, con mediciones morfométricas de la membrada externa. Objetivo 40X. Barra de escala de 40 μ m.

La figura 15A, muestra el control negativo, con DMSO al 0.1%, en el cual no se observan cambios morfométricos y se aprecian las crestas cuticulares. Sin embargo, en la figura 15B se pueden observar cambios en la cutícula del nematodo, del mismo modo, se observan cambios en el engrosamiento de la cutícula del nematodo en la figura 15C, la cual hace referencia al tratamiento del ácido linoleico comercial a 5 mg/mL, tras 50 minutos de exposición, se puede observar que las crestas cuticulares se desvanecieron y una notable vacuolización muscular; se tomaron las mediciones, posteriormente se realizó un ANOVA de una vía y comparación de medias entre sí con el software GraphPad Prism, obteniendo diferencias significativas entre los tres tratamientos (Figura 16).

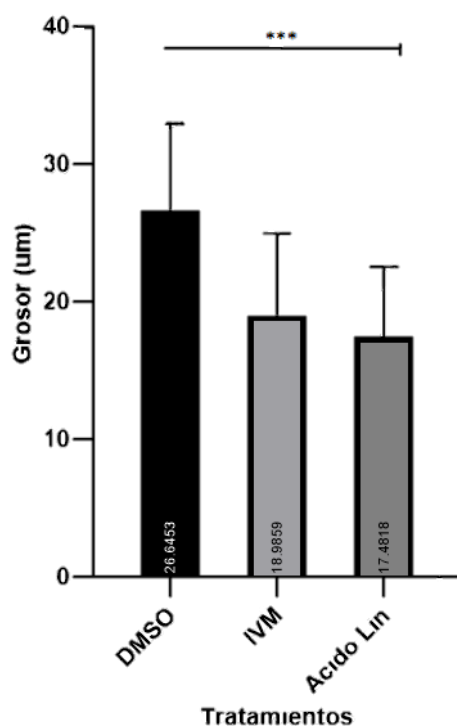
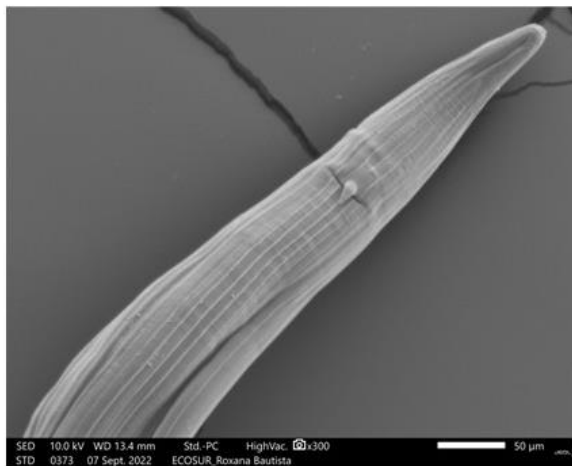


Figura 16. Gráfica de comparación de medias de grosor de epicutícula de adultos de *H. contortus*, DMSO 0.1% (control negativo), ivermectina 0.1% (control positivo) y ácido linoleico comercial (tratamiento). ***Diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0.01$).

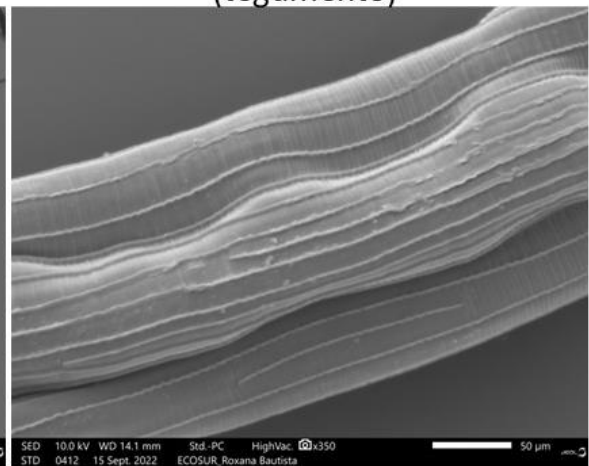
7.5 Alteraciones morfológicas en adultos de *H. contortus* postconfrontación con el ácido linoleico mediante Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

Se obtuvieron microfotografías de la parte anterior media y posterior de los dos grupos testigo y ácido linoleico, de los cuales solo se muestran la parte anterior (región cefálica) y media, con énfasis en el tegumento del nematodo, ya que se mostraron cambios en la ultraestructura principalmente en la cutícula (Figura 17).

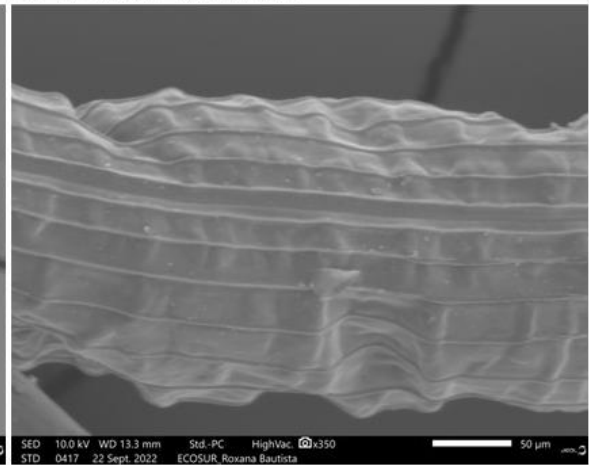
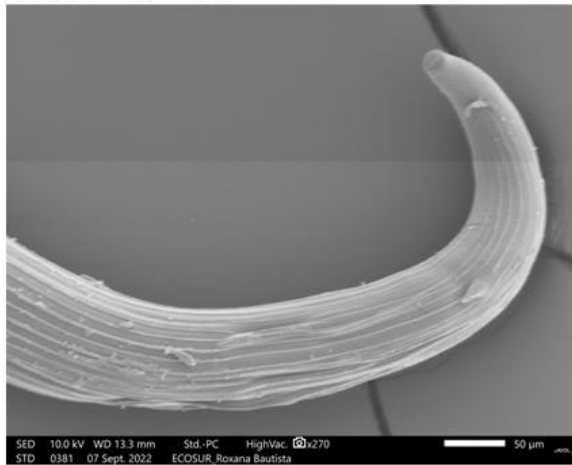
Control
negativo
DMSO 0.1%



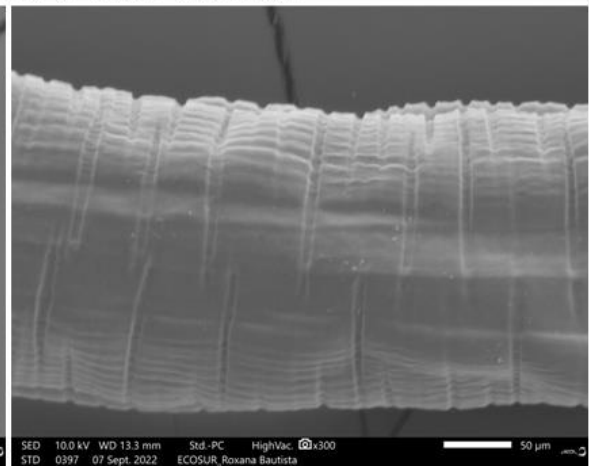
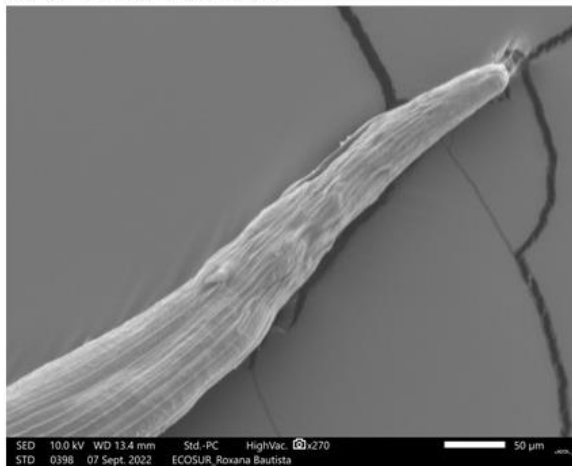
Región media
(tegumento)



Control
positivo
IVM 0.1%



Tratamiento
con
Ácido linoleico
5 mg/mL



Ultraestructura externa de *H. contortus* adulto en contacto con DMSO 0.1% (control negativo), IVM 0.1% (control positivo) y ácido linoleico comercial (tratamiento) bajo condiciones *in vitro*.

Los principales cambios observados entre el control negativo (DMSO 0.1%), control positivo (IVM 0.1%) y el ácido linoleico comercial es en la superficie del cuerpo (cutícula) y la región anterior o cefálica. El cuerpo de los nematodos en DMSO 0.1% presentaban una superficie de cutícula lisa, sin presencia de agregados o partículas en el tegumento, los parásitos tratados con ivermectina y ácido linoleico perdieron su aspecto normal mostrando pliegues longitudinales y transversales y crestas más gruesas en la cutícula. Estas alteraciones ultraestructurales se

observaron en la mayor parte del cuerpo del nematodo, principalmente mostrado en el tratamiento con ácido linoleico el cual mostró ruptura en pliegues de la cutícula y una mayor hinchazón de ésta, así como pérdida de crestas cuticulares con énfasis en la parte media, a diferencia del tratamiento con IVM que, a pesar de mostrar cambios cuticulares, no perdió del todo su composición cuticular como con el ácido linoleico comercial.

VIII. DISCUSIÓN

Los metabolitos secundarios provenientes de los hongos comestibles del género *Pleurotus* spp. han mostrado diversas propiedades, entre ellas, la antiparasitaria principalmente antihelmíntica contra céstodos y nematodos parásitos de importancia agropecuaria.

El nematodo *H. contortus* provoca pérdidas económicas considerables y cuantiosas por lo que se ha utilizado como modelo biológico en diferentes estudios utilizando metabolitos secundarios de hongos comestibles en la búsqueda de las moléculas con capacidad nematicida.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de las pruebas *in vitro* de la fracción PdR-2 contra larvas infectantes (L3) con vaina de *H. contortus*, demostraron que el mayor efecto nematicida fue del 100% a 80 mg/mL y 87.5% a 60 mg/mL, en comparación con un estudio realizado por nuestro grupo de investigación, González-Cortázar *et al.* (2020), que realizaron pruebas *in vitro* con la misma fracción (PdR-2) en larvas infectantes (L3) sin vaina de *H. contortus* y obtuvieron actividad nematicida de 80.75% a las 72 h con 20 mg/mL; sin embargo, la vaina tiene la función de proteger a los nematodos de factores bióticos y abióticos, debido a eso, las dosis efectivas en el presente trabajo fueron más elevadas, para poder penetrar la vaina protectora y ejercer su efecto en las larvas, dando otra alternativa de uso: aspersión en potreros.

En este contexto la fracción PdR-2 también mostró tener efectividad nematicida contra el nematodo agallador *Meloidogyne enterolobii*, (de gran impacto en hortalizas), en estadio J2s con un porcentaje de mortalidad mayor al 84% a una concentración de 0.123 mg/mL (Gómez-Rodríguez *et al.*, 2022). En contraste con el presente trabajo se puede inferir que la concentración nematicida efectiva varía, debido a que son nematodos de ambientes diferentes, siendo *H. contortus* un NGI, posee mayor protección en su cutícula para atravesar el tracto gastrointestinal y llegar con éxito al abomaso; a diferencia de un nematodo que infecta hortalizas, ya que las condiciones ambientales a las que se exponen son completamente distintas. Sin embargo, en ambos nematodos se demuestra la efectividad nematicida de la fracción PdR-2.

Por otro lado, un estudio notificado por Acevedo-Ramírez *et al.* (2020), observaron actividad nematicida en larvas infectantes (L3) con vaina de *H. contortus*, utilizando un tanino hidrolizable obtenido de la planta *Castanea sativa* y observaron separación de la vaina y retracción del cuerpo larvario. En comparación con lo observado microscópicamente en larvas infectantes (L3) de *H. contortus* del presente trabajo, se percibió separación de la vaina en muy pocos especímenes; sin embargo, se visualizaron partículas similares a las esporas con los tratamientos de la fracción PdR-2 a las concentraciones más altas a partir de 40 mg/mL hasta 80 mg/mL.

En las pruebas *in vitro* con adultos de *H. contortus* con la fracción PdR-2 a la hora de incubación se obtuvieron porcentajes de mortalidad bajos en las dos concentraciones más bajas (27.46% a 0.3125 mg/mL y 22.26% a 0.625 mg/mL) y 8.39% de mortalidad con el grupo testigo negativo, lo que puede sugerir que la fracción PdR-2 no posee efecto nematocida en adultos y esto puede ser posible debido a los cambios fisiológicos que sufren los nematodos en su desarrollo de larva a adulto.

Es importante mencionar que las necesidades energéticas de una larva y un adulto de *H. contortus* difieren, esto podría justificar que la fracción PdR-2 no haya tenido efecto en adultos, al contrario, mostraron mayor viabilidad, principalmente con la molécula sintética Allitol (2.5 mg/mL), la cual se encuentra en la fracción PdR-2, al igual que un terpeno aun no identificado, en una proporción 9:1.

El Allitol siendo un azúcar, mantuvo viables por más tiempo a los nematodos y se puede inferir que les proporcionó energía y evitó la muerte, lo que podría explicar por qué pasadas las 18 horas de incubación con la fracción PdR-2, se observó un porcentaje de mortalidad de 25% con el Allitol, 63.3% de mortalidad con la concentración más alta de la fracción PdR-2 (5 mg/mL) y 100% de mortalidad en las concentraciones descendentes (de 2.5 a 0.312 mg/mL). Demostrando que entre mayor sea la concentración de la fracción PdR-2, mayor será la cantidad de Allitol y por consecuencia, mayor viabilidad.

Debido a esto es que sería de gran utilidad la elucidación del terpeno contenido en la fracción PdR-2, para identificar si existe sinergismo en el efecto nematocida en larvas (estadio en el que sí se observó y se ha notificado mortalidad) e identificar si este terpeno probablemente pueda tener efecto nematocida por sí solo en adultos de *H. contortus* y del mismo modo realizar pruebas *in vitro* con más réplicas y menos tiempos de lectura.

En los resultados obtenidos en las pruebas *in vitro* con el ácido linoleico comercial se obtuvieron altos porcentajes de mortalidad (75%) a partir de 5 mg/mL a los 50 min postconfrontación en adultos de *H. contortus*. Pineda-Alegría *et al.*, (2020), realizaron un estudio con ácidos grasos comerciales, los cuales anteriormente habían sido notificados en el hongo comestible *P. djamor* (Pineda-Alegría *et al.*, 2017); utilizaron un terpeno (B-sitosterol) y cuatro ácidos grasos comerciales, entre ellos el ácido linoleico (ácido cis, cis-9,12-Octadecadienoico); evaluaron de manera individual y en combinación los ácidos grasos contra huevos y larvas infectantes (L3) de *H. contortus*, obteniendo 41.59% de inhibición en la eclosión de huevos y 100% de mortalidad larvaria a las 72 h a 10 mg/mL utilizando la combinación de los cuatro ácidos grasos, demostrando en el presente estudio que el ácido linoleico también posee efecto nematocida en estadio adulto.

Hay diversos estudios que informan sobre los grandes beneficios que tiene el ácido linoleico conjugado en humanos y animales superiores, como el estudio realizado por Jimenez-Penago, (2020), utilizó ácido linoleico conjugado en

una dieta para ovinos y en sus resultados notificó que hubo larvas infectantes (L3) de *H. contortus* que lograron llegar a estadio adulto sin embargo no fueron reproductivas, ya que tuvo recuentos bajos de HPG. Aunado a ello, el ácido linoleico conjugado les confirió un mejor aprovechamiento de nutrientes en la alimentación.

A pesar de que en el estudio mencionado anteriormente realizaron experimentos con ácido linoleico conjugado, los resultados parecen ser muy similares en cuanto al efecto antiparasitario que posee. Sin embargo, sería muy enriquecedor poder comparar el efecto nematocida de ambos ácidos grasos (linoleico y conjugado) en el ámbito agropecuario y tomar en cuenta el costo beneficio de cada uno, para favorecer en un futuro a los productores agrícolas y pecuarios, facilitándoles el acceso a estos productos.

En cuanto a los resultados morfométricos se encontraron diferencias en el grosor de la cutícula, incluyendo envoltura externa, hipodermis y capa muscular, donde se observó la lisis de las crestas cuticulares provocadas por el ácido linoleico al igual que en la ivermectina.

Se observaron también los cambios ultraestructurales mediante MEB, en los que se percibieron diferencias tegumentarias, principalmente con el ácido linoleico comercial, que perdió por completo la histoarquitectura normal de la cutícula, donde se eliminaron por completo las crestas cuticulares que le sirven de adherencia al hospedero y se observó ruptura por pliegues principalmente en la parte media, lo que sugiere un aumento de permeabilidad de la membrana, ya que se observa la membrana hipertónica.

Del mismo modo Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al*, (2012), en su experimento *in vitro* e *in vivo*, donde expusieron a adultos de *H. contortus* con plantas ricas en taninos; encontraron cambios ultraestructurales en tegumento. Sin embargo, ellos tuvieron mayor presencia de partículas o agregados en la cutícula, principalmente alrededor del aparato reproductor de hembra y porción cefálica, lo que sugieren que podría afectar su movimiento, nutrición, metabolismo e incluso su actividad reproductiva.

En este trabajo se observaron menos partículas en tegumento, pero mayor afectación en su estructura, lo que propone que afecta la movilidad y metabolismo, específicamente en el intercambio de solutos y gases mediante la cutícula; también un posible daño al sistema nervioso, ya que existen cordones hipodérmicos nerviosos dorsales, que al ponerse en contacto con el ácido graso podría afectar sus funciones vitales, o producir un efecto agonista en los receptores GABA, provocando parálisis flácida y la muerte como la ivermectina.

Por otro lado, Shalaby *et al.*, (2020), evaluaron el efecto antihelmíntico de los frutos *Balanites aegyptiaca*, donde observaron histoarquitectura y ultraestructura, notificando daños principales a la cutícula, como hinchazón, desprendimiento de cutícula y exposición de la lámina basal, los daños se observados fueron con mayor intensidad a una concentración mayor (400 µg/mL) y entre menor era la concentración, menores daños.

Se sugiere que existe aumento de permeabilidad de la membrana al hacer el intercambio de solutos hidrosolubles por acuosos, en el caso de la ivermectina y ácidos grasos, generando una hiperpolarización, atravesando hasta la musculatura, provocando una parálisis muscular. Hace unos años atrás se realizó una revisión de los sitios de acción de los fármacos antihelmínticos, los cuales son absorbidos por la cutícula de los nematodos, pero tienen diferentes sitios de acción (Martin *et al.*, 1997), por lo que sería de gran relevancia identificar el mecanismo de acción específico del ácido linoleico, para contrarrestar lo mayor posible el desarrollo de una resistencia hacia esta molécula en un futuro.

IX. CONCLUSIONES

1. Las concentraciones de la fracción PdR-2 con mayor porcentaje de mortalidad contra larvas infectantes (L3) de *H. contortus* fueron a 80 mg/mL y 60 mg/mL, obteniendo 100% y 87.5% respectivamente.
2. El efecto nematocida de la fracción PdR-2 en adultos de *H. contortus* no se observó; sin embargo, mostró mayor viabilidad de estos a mayor concentración de la fracción PdR-2 a 1 y 18 h postconfrontación, principalmente utilizando el allitol puro, que es una de las moléculas que posee la fracción utilizada.
3. La determinación de parámetros morfométricos en adultos de *H. contortus* en bioensayos con ácido linoleico comercial, demostró que el ácido penetra a través de la membrana y provoca un adelgazamiento de este al igual que una lisis de crestas cuticulares.
4. Del mismo modo se observan cambios ultraestructurales del tegumento mediante MEB, donde se aprecia que existe aumento de permeabilidad de membrana y de igual manera se observa lisis de crestas cuticulares y aberturas en tegumento posiblemente por el exceso de solutos acuosos penetrados en la membrana cortical.

X. PERSPECTIVAS

1. Elucidación del terpeno no identificado de la fracción PdR-2 del hongo comestible *P. djamor* por técnicas espectroscópicas (RMN).
2. Realización de pruebas *in vitro* de ambas moléculas sintéticas por separado y determinar el mecanismo de acción que posee en nematodos y/o en otros agentes patógenos mediante estudios computacionales como pruebas *in silico*, network pharmacology y dinámica molecular.
3. Aplicación del ácido linoleico comercial como antiparasitario en otros agentes patógenos internos y externos que afecten a otras especies de interés veterinario e identificar el mecanismo de acción específico que posee la molécula sintética.

XI. LITERATURA CITADA

- Acevedo-Ramírez, P. M. del C., Hallal-Calleros, C., Flores-Pérez, I., Alba-Hurtado, F., Mendoza-Garfías, M. B., Castro del Campo, N., & Barajas, R. (2019). Anthelmintic effect and tissue alterations induced *in vitro* by hydrolysable tannins on the adult stage of the gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 266, 1–6.
- Aguilar-Caballero, A. J., Torres-Acosta, J. F. J, Cámara, S. R., Hoste, H., Sandoval-Castro, C. A. (2008). Inmunidad contra los nematodos gastrointestinales: La historia caprina. *Tropical and Subtropical Agroecosystems: Review*. 9(1): 73-82.
- Aguilar-Caballero, A., Cámara-Sarmiento, R., Torres-Acosta, F., Sandoval-Castro, C. A. (2011). El control de los nematodos gastrointestinales en caprinos: ¿dónde estamos? *Bioagrociencias*. 4(2): 10-15.
- Aguilar-Marcelino, L., Mendoza-de-Gives, P., Torres-Hernández, G., López-Arellano, M.E., González-Garduño, R. (2020). *Butlerius butleri* (Nematoda: Diplogasteridae) Feeds on *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infective larvae and free-living nematodes in sheep faecal cultures under laboratory conditions: Preliminary report. *Acta Parasitológica*. pp 1-8
- Aguilar-Marcelino, L., Villar-Luna, E., Gómez-Rodríguez, O., Pineda Alegría, J. A., Morales-Soto, I., Mendoza-de-Gives, P. (2017). Depredación *in vitro* del ácaro *Sancassania Mycophaga* (= *Caloglyphus Mycophagus*) Berlese (Acari: Acaridae) contra el nematodo fitopatógeno *Nacobbus aberrans* (J2). *Entomología mexicana* 4: 144–149.
- Al-ani, Laith Khalil Tawfeeq., Aguilar-Marcelino, L., Fiorotti, J., Sharma, S., Sarker, M. S., Furtado, E.L., Wijayawardene, N.N., Herrera-Estrella, A. (2020). Biological control agents and their importance for plant health. In: *Microbial Services in Restoration Ecology*. (Eds) Singh J.S., Raj Vimal S. Elsevier. U.S.A. pp 13-36.
- Alcalá-Canto, Y., Ocampo-Camberos, L., Sumano-López, H., Gutiérrez-Olvera, L., Tapia Pérez, G. (2016). Anthelmintic resistance status of gastrointestinal nematodes of sheep to the single or combined administration of benzimidazoles and closantel in three localities in Mexico. *Veterinaria México*. 3(4): 1-11.
- Antonio-Irineo, N., Flota-Bañuelos, C., Hernández-Marín, A., Arreola-Enríquez, J., Fraire-Cordero, S. (2021). Estudio preliminar sobre la inhibición *in vitro* de nematodos gastrointestinales de ovinos con extractos acuosos de plantas forrajeras. *Abanico Veterinario*. 11: 1-15.

- Anziani, O. S., Fiel, C. A. (2015). Resistencia a los antihelmínticos en nematodos que parasitan a los rumiantes en la Argentina. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 41(1): 34-46.
- Ayala, J. L., Henderson, D. (2017). Potencial de los Baculovirus para el manejo de plagas agrícolas en Cuba. *Revista Centro Agrícola*. 44(3): 80-87.
- Badii, M. H., Abreu, J. L. (2006). Biological control a sustainable way of pest control. *Internacional Journal of Good Conscience*. 1(1): 82-89.
- Barreto-Torres, H. (2014). Determinación de la Prevalencia de *Haemonchus contortus* en ovinos en el Municipio de Ixmiquilpan, Hidalgo, México. Tesis de Grado. Torreón, Coahuila, México.
- Basto-Estrella, G., Rodríguez-Vivas, R. G., Delfín-González, H., Reyes-Novelo, E. (2012). Escarabajos estercoleros (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae) de ranchos ganaderos de Yucatán, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 83(2): 380-386.
- Beltrán-Gala, J., Conradi-Barrena, M. and Gutiérrez-Castillo, J., 2022. Zoowiki. [online] Bioscripts.net. Available at: <<https://www.bioscripts.net/zoowiki/temas/15D.html>> [Accessed 3 February 2021].
- Boom, C. J., Sheath, G.W. (2008). Migración de larvas de nematodos gastrointestinales de las palmaditas fecales del ganado hacia el pasto pastable. *Parasitología veterinaria*. 157 (3-4): 260-266.
- Bowman D.D., Lynn R.C. Georgis.Novena (Ed.) (2011). Parasitología para veterinarios. Madrid, España. Edit. Elsevier. pp. 152- 17.
- Bulman, M. G. (2012). Pérdidas económicas directas e indirectas por parásitos internos y externos de los animales domésticos en Argentina. *Anales de la academia nacional de agronomía y veterinaria*. 76-176.
- Castañeda-Ramírez, G. S., Mathieu, C., Vilarem, G., Hoste, H., Mendoza de Gives, P., González-Pech, P.G., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A. (2017). Age of *Haemonchus contortus* third stage infective larvae is a factor influencing the *in vitro* assessment of anthelmintic properties of tannin containing plant extracts. *Parasitología veterinaria*. 243: 130-134.
- Castañeda-Ramírez, G. S., Torres-Acosta, J. F. de J., Sánchez, J. E., Mendoza-de-Gives, P., González-Cortázar, M., Zamilpa, A., Al-Ani, L. K. T., Sandoval-Castro, C., de Freitas, S. F. E., Aguilar-Marcelino, L. (2020). El posible uso biotecnológico de bioproductos de hongos comestibles para el control de nematodos parásitos de plantas y animales. *BioMed Research International*. pp. 1–12.

- Castañeda-Ramírez, S., Fourquaux, S., González Pech, P. G., Torres-Acosta, F. (2019). Alteraciones estructurales en huevos y larvas de parásitos gastrointestinales expuestos a extractos de cacao y avellana. Conferencia: 15ª reunión internacional de investigación en productos naturales (Amipronat), 22-25 de mayo 2019. En San Luis Potosí, México.
- Cazajous, T., Prevot, F., Kerbiriou, A., Milhes, M., Grisez, C., Tropee, A., Godart, C., Aragon, A., Jacquiet, P. (2018). Multiple-resistance to ivermectin and benzimidazole of a *Haemonchus contortus* population in a sheep flock from mainland France, first report. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*. 14: 103–105.
- Ciaincio, A. (2018). Biocontrol potential of *Pasteuria* spp. for the management of plant parasitic nematodes. *CAB Reviews*. 2018(13): 1-13.
- Comans-Pérez, J., Sánchez-Royse, J.E., Laith Khalil Tawfeeq, A.-A., González-Cortázar, M., Castañeda-Ramírez, G.S., Mendoza-de Gives, P., Sánchez-García, A.D., Millán-Orozco, J., Aguilar-Marcelino, L. (2020). Biological control of sheep nematode *Haemonchus contortus* using edible mushrooms. *Biological Control*. (152):1-8.
- Condemarín, M. C., Oyola, M. M., Mialhe, E., Quimi, M. J., Astudillo, U. S., Gutiérrez, C. S., Barreto, C. C., Túllume, P. C., Duarte, P., León, T. G. (2018). Efecto de bacterias nativas del suelo cultivado y prístino sobre el control del nematodo agallador radicular *Meloidogyne javanica*, en condiciones *in vitro* y producción de biomasa. *Arnaldoa*. 25(2): 515-528.
- Cruz-Arévalo, J. (2017). Estudio químico biodirigido de cuerpos fructíferos del hongo comestible: *Pleurotus eryngii* con actividad nematocida. Tesis de maestría. Chiapas, México.
- Cuéllar, O. J. A. (2009). Nuevas opciones para el control de nematodos gastroentéricos en ovinos. Recuperado de: <http://www.iberovinos.com/>
- Cuevas-Padilla, E. J. (2019). Evaluación *in vitro* de extractos crudos de *Pleurotus* sp., y la participación de sus proteínas contra *Haemonchus contortus*. Tesis de maestría. Morelos, México.
- Dutta, B., Konch, P., Rahman, T., Upadhyaya, T. N., Pathak, D. C., Tamuli, S. M., Phangchoo, C. V., Begum, S. A. (2017). Occurrence and pathology of *Haemonchus contortus* infection in Goats. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 5(3): 1284-1287.
- Esteban-Andrés, D., González-Garduño, R., Garduza-Arias, G., Ojeda-Robertos, N. J., Reyes-Montes, F., Gutiérrez-Cruz, S. (2013). Desarrollo de resistencia a nematodos gastrointestinales en ovinos de pelo desafiados con diferentes niveles de infección. *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 60 (3): 169-181.
- FAOSTAT (2020). Población mundial de ganado. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QA/visualize>

- Feldman, A. T., & Wolfe, D. (2014). Tissue Processing and Hematoxylin and Eosin Staining. *Methods in Molecular Biology*, 31–43.
- Fernandes, A., Barros L., Martins, A., Herbert, P., Ferreira, I.C.F.R. (2015). Nutritional characterization of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) P. Kumm. produced using paper scraps as substrate. *Food Chemical*. 169: 396-400.
- Gallego J.R., Mellado-López L., Cabello, T. (2020) Selección de una especie de *Trichogramma* (Hym., Trichogrammatidae) para el control biológico de la polilla de la patata *Phthorimaea operculella* (Lep., Gelechiidae) mediante el estudio del comportamiento de parasitación del huésped. *Técnica Económica Agraria*. 116(1): 2-18.
- Gómez-Rodríguez, O., Pineda-Alegría, J. A., Castañeda-Ramírez, G. S., González-Cortázar, M., Sánchez, J. E., Aguilar-Marcelino, L. (2022). Actividad nematicida *in vitro* de la fracción PdR-2 de *Pleurotus djamor* contra *J2 Meloidogyne enterolobii*. *Mexican Journal of Phytopathology*. 40(2): 1-9.
- González, G. R., Córdoba, P. C., Torres, H. G., Mendoza de Gives, P., Arece, G. J. (2011). Prevalencia de parásitos gastrointestinales en ovinos sacrificados en un rastro de Tabasco, México. *Veterinaria México*. 42(2): 125-135.
- González-Cortázar, M., Sánchez, J. E., Huicochea-Medina, M., Hernández-Velázquez, V. M., Mendoza-de-Gives, P., Zamilpa, A., López-Arellano, M. E., Pineda-Alegría, J. A., Aguilar-Marcelino, L. (2020). *In vitro* and *in vivo* Nematicide Effect of Extract Fractions of *Pleurotus djamor* Against *Haemonchus contortus*. *Journal of Medicinal Food*. 00(0):1-9.
- González-Garduño, R., Navarro, F., Arias, J., Gutiérrez, S., Zaragoza, M., Zaragoza, C. (2013). Descripción morfológica de *Haemonchus contortus* y *Mecistocirrus digitatus* de ovinos y bovinos en Tabasco, México. *Avances en Ciencias Veterinarias*. 28(2): 76-85.
- González-Muñoz, M. A. (2014). Determinación de la prevalencia de *Haemonchus contortus* en el programa ovino de la quinta experimental Punzara de la Universidad Nacional de Loja. Tesis de grado. Loja, Ecuador.
- Herrera-Manzanilla, F. A., Ojeda-Robertos, N. F., González-Garduño, R., Cámara-Sarmiento, R., Torres-Acosta, J. F. J. (2017). Gastrointestinal nematode populations with multiple anthelmintic resistance in sheep farms from the hot humid tropics of Mexico. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 9: 29-33.
- Herrera-Manzanilla, F. A., Ojeda-Robertos, N. F., González-Garduño, R., Cámara-Sarmiento, R., Torres-Acosta, J. F. J. (2017). Gastrointestinal nematode populations with multiple anthelmintic resistance in sheep farms from the hot humid tropics of Mexico. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*. 9: 29–33.

- Jiménez-Penago, G. (2020). Ácido linoleico conjugado en la dieta de ovinos pelibuey en la zona tropical de México: Respuesta en comportamiento productivo, inmune y parasitario. Tesis de maestría. Montecillo, Texcoco, Estado de México.
- Kwok, OCH, Plattner, R., Weisleder, D. y Wicklow, DT (1992). Una toxina nematicida de *Pleurotus ostreatus* NRRL 3526. *Journal of Chemical Ecology*, 18(2), 127–136.
- Li, H. G., Zhang, K. Q. (2014). Nematode-Toxic Fungi and their Nematicidal Metabolites. *Fungal Diversity Research Series*. 313–375.
- López, A. M. E., Mendoza G. P. (2011). La Importancia de las parasitosis internas en rumiantes domésticos y resistencia a los antihelmínticos. En: Memorias XVI Congreso de Producción 59 Ovina y VIII Seminario Internacional de Producción de Ovinos en el Trópico. Villahermosa, México.
- Marquéz-Lara, D. (2014). *Control sostenible de los nematodos gastrointestinales en rumiantes*. (1 ed.). Bogotá, Colombia: Corpoica. pp. 20-347.
- Martin, R. J., Robertson, A. P., Bjorn, H. (1997). Target sites of anthelmintics. *Parasitology*, 114(7), 111–124.
- Martínez-Ortíz-de-Montellano, C., Arroyo-López, C., Fourquaux, I., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., (2012). Scanning electron microscopy of *Haemonchus contortus* exposed to tannin-rich plants under *in vivo* and *in vitro* conditions. *Experimental Parasitology*.
- Medina, P., Guevara, F., La O, M., Ojeda, N., Reyes, E. (2014) Anthelmintic resistance in sheep: a review of reports of southeastern Mexico and alternatives for the control of gastrointestinal nematodes. *Pastos y Forrajes*. 37(3): 257-263.
- Méndez-Santiago, E.W. (2020). Actividad nematicida de *Serratia* sp. contra el nematodo agallador *Nacobbus aberrans*. Tesis de maestría. Cuernavaca, Morelos, México.
- Mendoza-Jiménez Y.L., Eusebio-Moreno J.C., Álvarez-García R., Abreu-Corona A., Téllez-Jurado A., Tovar-Jiménez X. (2017). Liberación de Péptidos Antioxidantes por medio de la Hidrólisis Enzimática del Concentrado Proteico de *Phaseolus vulgaris* cv Negro Primavera-28. Simposio Iberoamericano Multidisciplinario de Ciencias e Ingenierías. 5(5): 28-31.
- Muchiut, S. M., Fernández, A. S., Steffan, P. E., Riva, E., & Fiel, C. A. (2018). Anthelmintic resistance: Management of parasite refugia for *Haemonchus contortus* through the replacement of resistant with susceptible populations. *Veterinary Parasitology*. 254: 43–48.

- Munguía-Xóchihua, J., Navarro-Grave, R., Hernández-Chávez, J., Molina-Barrios, R., Cedillo-Cobián, J., Granados-Reyna, J. (2018). Gastroenteric parasites and parasitic burdens of *Haemonchus contortus* in goat from the semiarid climate of the Bacum, Sonora, Mexico. *Abanico veterinario*. 8(3):42-50.
- Muñiz-Lagunes, A., González-Garduño, R., López-Arellano, M. E., Ramírez-Valverde, R., Ruíz-Flores, A., García-Muñiz, G., Ramírez-Vargas, G., Mendoza-De-Gives, P., Torres-Hernández, G. (2015). Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes from grazing beef cattle in Campeche State, Mexico. *Tropical Animal Health and Production*. 47(6): 1049–1054.
- Naeem, M., Iqbal, Z. y Roohi, N. (2020). Haemoncosis ovina: una revisión. *Sanidad y producción de animales tropicales*. 53(1): 1-11.
- Navarrete, I., Serrano, F., Reina, D. (1999). Parasitosis hemáticas. En: M. Cordero, F. Rojo, A. Martínez, C. Sánchez, S. Hernández., I. Navarrete., Díaz, P., Quiroz, H., Carvalho, M. *Parasitología Veterinaria* (1a ed). Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España. pp. 283-293.
- Navone G. T., Achinelly, M. F., Notarnicola, J., Zonta, M. L. (2017). Capítulo 9: *Phylum* Nematoda. En *Macroparásitos: diversidad y biología* (págs. 128–156). Editorial de la Universidad de la Plata. https://digital.cic.gba.gob.ar/bitstream/handle/11746/7148/11746_7148.%20Diversidad%20y%20biolog%C3%ADa_Parte9.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Ninamancco C.A.C, Pinedo V.R, Chávez V.A. (2021). Frecuencia de nematodos gastrointestinales en ovinos de tres distritos de la Región Ancash, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 32(2): 1-11.
- NOM-033-SAG/ZOO-2014, (2014). Norma Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres.
- Padilla-Álvarez, F., Cuesta-López, A. E. (2003). *Zoología aplicada* (1.a ed., Vol. 1). Diaz Santos. https://books.google.com.pe/books?id=KGxTDwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Padilla-Amor, M. J. (2020). Estudio transversal de la infección por *Haemonchus contortus* en ovinos destetos de la granja El Socorro del municipio de Turbaco, departamento de Bolívar. Tesis de Licenciatura. Cartagena de Indias, Colombia.
- Panevska, A., Skočaj, M., Modic, Š., Razinger, J. y Sepčić, K. (2020). Panevska, A., Skočaj, M., Modic, Š., Razinger, J. y Sepčić, K. (2020). Aegerolysins from the fungal genus *Pleurotus* – Bioinsecticidal proteins with multiple potential applications. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107474.

- Peraza-Padilla, W., Orozco-Aveces, M., Esquivel Hernández, A., Rivera Coto, G., Chaverri-Fonseca, F. (2011). Aislamiento e identificación de hongos nematófagos nativos de zonas arroceras de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*. 22(2): 233-243.
- Pérez, N., Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*. 11(4).
- Pineda-Alegría, J. A., Sánchez, J. E., González-Cortazar, M., von Son-de Fernex, E., González-Garduño, R., Mendoza-de Gives, P., Zamilpa, A., Aguilar-Marcelino, L. (2020). *In vitro* nematocidal activity of commercial fatty acids and β -sitosterol against *Haemonchus contortus*. *Journal of Helminthology*, 94.
- Pineda-Alegría, J. A., Sánchez-Vásquez, J. E., González-Cortazar, A. Z., López-Arellano, M. E., Cuevas-Padilla, E. J., Mendoza de Gives, P., Aguilar-Marcelino, L. (2017). The edible mushroom *Pleurotus djamor* produces metabolites with lethal activity against the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Journal of Medicinal Food*. 20(12): 1184-1192.
- Pratt, W., Taylor, P. (1990). Drug resistance. En: principles of drug action. (3er ed.). Churchill Livingstone, Nueva York. pp. 556, 637.
- Rivera, N., Ibarra, F., Zepeda, A., Fortoul, T., Hernández, A., Castillo, R., Canté, G. (2004). Tegumental surface changes in adult *Fasciola hepatica* following treatment *in vitro* and *in vivo* with an experimental fasciolicide. *Parasitology Research*. 93(4): 283-286.
- Rodríguez-Barrera, T. M., Téllez-Téllez, M., Sánchez, E., Castañeda-Ramírez, G. S., Acosta-Urdapilleta, M. L., Bautista-Garfias, C. R., Aguilar-Marcelino, L. (2021). Edible mushrooms of the genus *Pleurotus* as biocontrol agents of parasites of importance for livestock. *Scientia Fungorum*. 52:1-13.
- Rodríguez-Vivas, R. I., Basto-Estrella, G. S., Reyes-Novelo, E., Arcilla-Fuentes, W., Ojeda-Chi, M. M., Trinidad-Martínez, I., Gutiérrez-Wong, J. (2020). Respuesta de *Canthon indigaceus chevrolati* Harold a las heces de bovinos tratados con lactonas macrocíclicas. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. 7(3): 1-9.
- Rodríguez-Vivas, R. I., Grisi, L., Pérez de León, A. A., Silva Villela, H., Torres-Acosta, J. F. J., Fragoso Sánchez, H., Romero Salas, D., Rosario Cruz, R., Saldierna, F., García Carrasco, D. (2017). Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 8(1): 61-74.
- Rojas, N., La, O.M., Arece, J., Carrión, M., Pérez, K., San Martín, C., Valerino, P., Ramírez, W. (2012). Identificación y caracterización de especies de *Haemonchus* en caprinos del valle del Cauto en Granma. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 13(1): 1-10.

- Rosenheim, JA y Hoy, MA (1989). Confidence Intervals for the Abbott's Formula Correction of Bioassay Data for Control Response. *Journal of Economic Entomology*. 82(2): 331–335.
- Ruiz, C., Díaz, C., Rojas, R. (2015). Composición química de aceites esenciales de 10 plantas aromáticas peruanas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 81(2): 81-94.
- Salmones, D. (2017). *Pleurotus djamor*, un hongo con potencial aplicación biotecnológica para el neotrópico. *Revista Mexicana de Micología*. 46: 73-85.
- Sánchez, J. E., Royse, D. J. (2017). La biología, el cultivo y las propiedades nutricionales y medicinales de las setas *Pleurotus spp.* 1ra ed. Pp 297-301.
- Sánchez, J. E., Royse, D. J. (Ed.) (2017). *La biología, el cultivo y las propiedades nutricionales y medicinales de las setas Pleurotus spp.* Chiapas México:g ECOSUR.
- Santiago-Figueroa, I., Lara-Bueno, A., González-Garduño, R., López-Arellano, ME, de la Rosa-Arana, JL, y Maldonado-Simán, E. de J. (2019). Resistencia antihelmíntica en granjas de ovinos de pelo en clima tropical subhúmedo, en la Huasteca Potosina, México. *Parasitología veterinaria: Estudios e informes regionales*. 17(19): 1-4.
- SAS. (2009). SAS Institute. Cary. North Carolina, USA. 1028.
- Shalaby, H. A., Hassan, N. M.F., Nasr, S. M., Farag, T.K., Abu El Ezz, Nadia M.T., Abou-Zeina, Hala A.A. (2020). An anthelmintic assessment of *Balanites aegyptiaca* fruits on some multiple drug resistant gastrointestinal helminthes affecting sheep. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences*. 51(1): 93-103.
- Sharma, SK, Gautam, N. (2015). Chemical, Bioactive, and Antioxidant Potential of Twenty Wild Culinary Mushroom Species. *BioMed Research International*. 2015:1-12.
- SIAP (2020). Ovinos y caprinos, población ganadera 2019. Disponible en: <https://www.gob.mx/siap/documentos/poblacion-ganadera-136762>.
- Sierra-Sarmiento, M. A., Barros-Algarra, R., Gómez-Paternina, D., Mejía-Terán, A., Suarez-Rivero, D. (2018). *Productos Naturales: Metabólicos Secundarios y Aceites Esenciales*. Bogotá, Colombia: Entrelibros E-Book Solutions. pp: 7-50.
- Singh, J. (2012). A study on the structure and distribution of ridges in the cuticle of *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803) Cobb, 1898. *Journal of Bio Innovation*. 1(6): 264-275.

- Soulsby, E. (1987). *Parasitología y Enfermedades parasitarias en los Animales Domésticos*. (7 ed.). México D.F.: Interamericana. pp.192.
- Spratt, D.M. (1997). Estrategias de control de endoparásitos: implicaciones para la biodiversidad de la fauna nativa. *Revista Internacional de Parasitología*. 27(2): 173–180.
- Stadler M, Mayer A, Anke H, Sterner O. (1994). Fatty acids and other compounds with nematicidal activity from cultures of basidiomycetes. *Planta Med*. 60:128–132.
- Taki, A. C., Brkljača, R., Wang, T., Koehler, A. V., Ma, G., Danne, J., ... Gasser, R. B. (2020). Natural Compounds from the Marine Brown Alga *Caulocystis cephalornithos* with Potent *In vitro*-Activity against the Parasitic Nematode *Haemonchus contortus*. *Pathogens*, 9(7), 550.
- Taylor, M. A., Coop, R. L., Wall, R. L. (2016). *Veterinary Parasitology* (4a ed.). Wiley-Blackwell. [https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=jelbCwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR21&dq=Veterinary+parasitology+4+\(ed.\).+Chichester,+United+Kingdom:+Wiley+Blackwell.&ots=SjzSNOF7YI&sig=Ize4PNS0jWqpiMgL3MMJp1Q8vzQ#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=jelbCwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR21&dq=Veterinary+parasitology+4+(ed.).+Chichester,+United+Kingdom:+Wiley+Blackwell.&ots=SjzSNOF7YI&sig=Ize4PNS0jWqpiMgL3MMJp1Q8vzQ#v=onepage&q&f=false)
- Torres-Acosta, F., Beltrao-Molento, M., Mendoza-De-Gives, P. (2015). Resistencia antihelmíntica en Latinoamérica. Disponible en: <https://www.yumpu.com/es/document/read/14409956/resistencia-antihelmintica-en-latinoamerica/4>. [Acceso el 14 de marzo de 2021]
- Torres-Acosta, J. F. J., Hoste, H. (2008). Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Ruminant Research*. 77:159-173.
- Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., González-Pech, P. G., Mancilla-Montelongo, M. G., Ortega-Pacheco, A., Aguilar-Caballero, A. J., Santos-Ricalde, R. H., Sarmiento-Franco, L. A., Ramos-Bruno, E., Torres-Fajardo, R. A., & Méndez-Ortíz, F. A. (2021). Interacción entre la nutrición y los nematodos gastrointestinales en pequeños rumiantes pastoreando la selva baja caducifolia -Contribuciones de la FMVZ-UADY. *Tropical and Subtropicals Agroecosystems*. 24(127):1-18.
- Torres-Fajardo, R. A., Higuera-Piedrahita, R. I. (2021). Actividad antihelmíntica *in vivo* de terpenos y aceites esenciales en pequeños rumiantes. *Revista MVZ Córdoba*. 26 (3): 1-13.
- Trejo-López, T., Zepeda-Bastida, A., Franco-Fernández J., Soto-Simental, S., Ojeda-Ramírez, D., Ayala-Martínez, M. (2017). Uso de extracto enzimático de *Pleurotus ostreatus* sobre los parámetros productivos de cabras. *Abanico Veterinario*. 7(2): 14-21.

- Vélez-Terranova, M.; Campos Gaona, R.; Sánchez-Guerrero, H. (2014). Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis ruminal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 17(3):489-499
- Viteri, M. (2012). Estimación de las emisiones de compuestos orgánicos volátiles de la vegetación del Ecuador durante el año 2010. Tesis de grado. Quito, Ecuador.
- Wong-Villarreal, A., Méndez-Santiago, E. W., Gómez-Rodríguez, O., Aguilar-Marcelino, L., García, D. C., García-Maldonado, J. Q., Hernández-Velázquez, V. M., Yañez-Ocampo, G., Espinosa-Zaragoza, S., Ramírez-González, S. I., Sanzón-Gómez, D. (2021). Nematicidal Activity of the Endophyte *Serratia ureilytica* against *Nacobbus aberrans* in Chili Plants (*Capsicum annuum L.*) and Identification of Genes Related to Biological Control. 3;10(12):2655.
- Wu J, Shi S, Wang H, Wang, S. (2016). Mechanisms underlying the effect of polysaccharides in the treatment of type 2 diabetes: A review. *Carbohydrate Polymers* 144: 474-94.

XIII. APÉNDICES

12.1 Apéndice 1.

Cuadro de número de especímenes de *H. contortus* encontrados en los diferentes muestreos realizados en el presente trabajo.

FECHA	ANIMAL		EDAD	SEXO		<i>H. contortus</i>	PROCEDENCIA
04-03-22	Ovino	Caprino	1.5 años	Macho	Hembra	118	Tres Marías, Huitzilac, Mor.
25-03-22	X		1.5 años	X		127	
	X		6 meses	X		3500	
	X		8 meses		X	60	
22-04-22	X		2 años		X	10	
03-05-22		X	1.5 años		X	213	Amayuca, Jantetelco, Mor
		X			X	186	
06-05-22		X	1.5 años	X		241	Jonacatepec, Mor.
		X	2.5 años		X	226	
	X		1 año		X	0	
13-05-22	X		2 años		X	10	Temoac, Mor.
	X				X	0	
	X		1.5 años		X	392	Col. Iztaccíhuatl, Cuautla. Mor
		X		2.5 años		X	

12.2 Apéndice 2

Evaluación *in vitro* de la fracción PdR-2 del hongo comestible *P. djamor* en larvas infectantes (L3) con vaina de *H. contortus*.

MATERIALES:

- Placa de 96 pozos
- Suspensión con larvas infectantes (L3) de *H. contortus*
- PBS, pH 7.4
- Ivermectina (IVM) 5 mg/mL

- Fracción PdR-2, concentraciones (80, 60, 40, 20, 10 mg/mL)
- Micropipeta de 200 μ l y sus puntas
- Micropipeta de 20 μ l y sus puntas
- Microscopio óptico
- Portaobjetos

PROCEDIMIENTO:

En la placa de 96 pozos se colocaron 80 μ l de cada concentración de la Fracción PdR-2 por triplicado.

Se colocaron 80 μ l de PBS en tres pozos separados y en otros tres se coloca IVM.

Posteriormente se agregaron 20 μ l de suspensión de larvas infectantes (L3) en cada uno de los pozos con los diferentes tratamientos.

Se le puso su tapa a la placa y se metió a la incubadora a 28°C durante 72 h.

Pasado el tiempo, se realizaron lecturas de cada tratamiento mediante microscopio óptico, colocando 10 alícuotas de 10 μ l cada una en portaobjetos diferentes y se captura el número de larvas muertas y vivas por alícuota, para posteriormente obtener promedios y porcentajes de mortalidad con ayuda de los programas Excel y R commander.

12.3 Apéndice 3

Evaluación *in vitro* de la fracción PdR-2 del hongo comestible *P. djamor* en adultos de *H. contortus*.

MATERIALES:

- Placas petri de 5 mL
- Adultos de *H. contortus*
- Medio de cultivo RPMI
- Ivermectina (IVM) 0.1 mg/mL
- Fracción PdR-2, concentraciones (5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 mg/mL)
- Micropipeta de 1000 μ l y sus puntas
- Microscopio estereoscópico y óptico
- Portaobjetos
- Gancho o jeringa para manipulación de nematodos

PROCEDIMIENTO:

- En las cajas de Petri se colocaron 3 mL de cada concentración de fracción PdR-2, y grupos testigo (RPMI e IVM), por triplicado
- Posteriormente se agregaron 10 adultos de *H. contortus* en cada repetición de tratamiento.
- Se taparon y rotularon cada una de las cajas con tratamientos y se incubaron a 37°C (Figura 18).

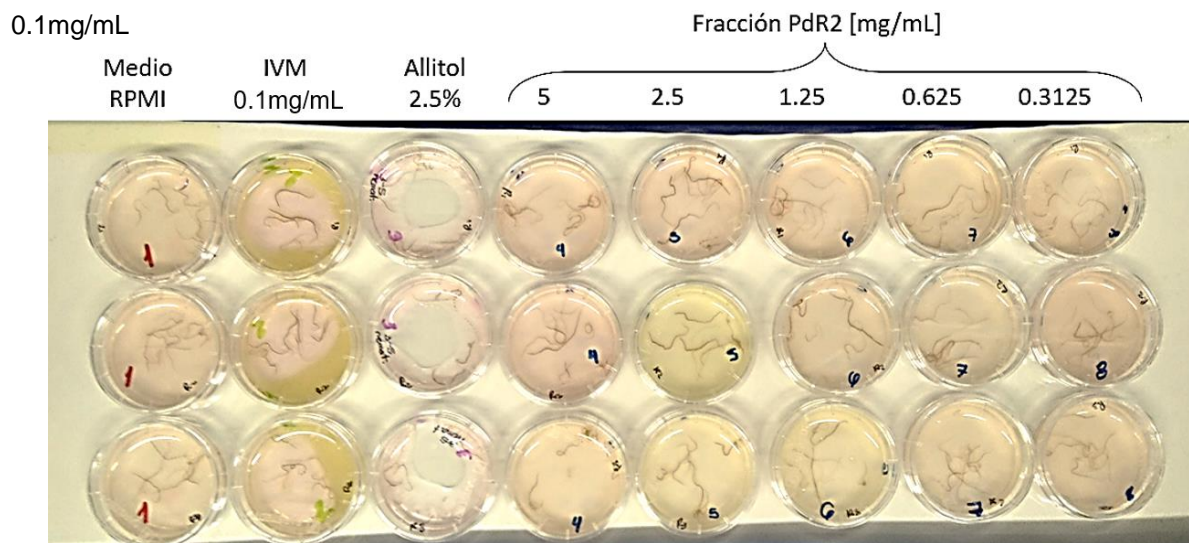


Figura 18. Diseño experimental de bioensayo de la fracción PdR-2 del hongo *P. djamor* contra adultos de *H. contortus*.

Fuente: Pérez-Montero, 2021.

- Se realizaron lecturas a la hora y 18 h. En cada lectura se observó mortalidad o movilidad de los nematodos mediante microscopio estereoscópico, considerando a los inmóviles y completamente estirados como muertos y a los móviles y enroscados como vivos.
- Se obtuvieron promedios y porcentajes de mortalidad con ayuda de los programas Excel y R commander.

12.4 Apéndice 4

6.4.3 Evaluación *in vitro* de ácido linoleico comercial en adultos de *H. contortus*.

MATERIALES:

- Placas de 6 pozos
- Adultos de *H. contortus*
- DMSO 0.1%

- Ivermectina (IVM) 0.1%
- Ácido linoleico, concentraciones (5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 mg/mL)
- Micropipeta de 1000 µl y sus puntas
- Microscopio estereoscópico y óptico
- Portaobjetos
- Gancho o jeringa para manipulación de nematodos

PROCEDIMIENTO:

- En las cajas de Petri se colocaron 4 mL de cada concentración del ácido linoleico, los cuales se diluyeron con DMSO 0.1%, y controles (DMSO 0.1% e IVM 0.1%), por triplicado cada tratamiento.
- Posteriormente se agregaron 12 adultos de *H. contortus* en cada repetición de tratamiento.
- Se taparon y rotularon cada una de las cajas con tratamientos y se incubaron a 37°C.
- Se realizaron lecturas cada 10 min. En cada lectura se observó mortalidad o movilidad de los nematodos mediante microscopio estereoscópico, considerando a los inmóviles y completamente estirados como muertos y a los móviles y enroscados como vivos.
- Se obtuvieron promedios y porcentajes de mortalidad con ayuda de los programas Excel y R commander.



Cuernavaca, Morelos, 09 de noviembre de 2022.

Asunto: Voto Aprobación de Tesis.

MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESENDIZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS.
P R E S E N T E.

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado:

“ESTUDIO SOBRE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA *in vitro* DE LA FRACCIÓN PdR-2 DE *Pleurotus djamor* Y EL ÁCIDO LINOLEICO COMERCIAL EN *Haemonchus contortus* que presenta la: **MVZ. XOCHITL ALONDRA PÉREZ MONTERO**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. FERNANDO IVÁN FLORES PÉREZ** y la Codirección de la **DRA. LILIANA AGUILAR MARCELINO**, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la alumna continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente

Por una humanidad culta

DRA. VIRGINIA GUADALUPE GARCÍA RUBIO

Comité Evaluador

C.i.p. Archivo

Av, universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México 62209

Tel (777)3297046, 3297000 Ext. 3304. fagropecuarias@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

VIRGINIA GUADALUPE GARCIA RUBIO | Fecha:2022-11-14 19:16:19 | Firmante

GyQC3d3Vj/ekFcS1nN1h2FPYCB4JpwZ1b3wyERIZA4zRdshL/SNrhQLd4s1ovq5H0YbAvp3n39xViNKDf193HI9O78+PPJglbWRCAnbU8wrpQlzigNLyy3s/WmMdViEqJlIVL+sbp QC7v2ZLyWxwySlt4q+fGiaDeK+cKALFgimMyFGgZS05N/ZWz4O8MCMW7SYxsx10j5TkygRLRhSQ18qVnqH2WZw3T25PAP2CzxLYK8vhckj6VLMUHRuOCN8spV5URo55dqa avg18OwnQhYuHkitOSdSJC4fJV7jNAYoee/Xd2O2KK8Q5qm1bDD3I4TIW1DUptS94BQBL3SiKuQ==



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

[ybG7nRd3z](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/NzWg0HSeqy3LV0SZIa7IZGUOS6n7aTxE>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS

Cuernavaca, Morelos, 09 de noviembre de 2022.

Asunto: Voto Aprobación de Tesis.

MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESENDIZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS.
P R E S E N T E.

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado:

“ESTUDIO SOBRE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA *in vitro* DE LA FRACCIÓN PdR-2 DE *Pleurotus djamor* Y EL ÁCIDO LINOLEICO COMERCIAL EN *Haemonchus contortus* que presenta la: MVZ. XOCHITL ALONDRA PÉREZ MONTERO, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del DR. FERNANDO IVÁN FLORES PÉREZ y la Codirección de la DRA. LILIANA AGUILAR MARCELINO, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi VOTO DE APROBACIÓN para que la alumna continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente

Por una humanidad culta

DRA. MARIANA PEDERNEIRA ROMANO

Comité Evaluador

C.i.p. Archivo

Av, universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México 62209

Tel (777)3297046, 3297000 Ext. 3304. fagropecuarias@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

MARIANA PEDERNERA ROMANO | Fecha:2022-11-15 10:19:37 | Firmante

M5UaG3ofyv+pl+ZOH0ijPUtgTZHi0d3IWLV1C1+XF3G0QszccfzMxMKUsbD/voDW4yWqH6qRm0JsEs5xYqPUNxqwzlaDX+w0rh05U+yKFafvC7jLYrElwiy+zq0AAR+G706sliqo
WYFo4xA44v10po7QRrtpZuMEJBf+V+iarMRXmolQqOq4jlkUlwy8wApoFb5nDReGsjYUjKedR9jlkT/LBuN1ndkOcGhUCL8d74ZQqnElpF/fw4/rc2lQIYh3nBSF8i/ujpZCv51KCP6
1R+Rs5jcAds1MLgdZiw9Cr2Ub6QzIRIOpak8UKHLSkVkJXJieX7wVg69JzqhxMM83Q==



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

[rc4L5VU2l](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Qh6LHXDsY9OrAFhcOVcUtK1BWeCGFzmz>





Cuernavaca, Morelos, 09 de noviembre de 2022.

Asunto: Voto Aprobación de Tesis.

MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESENDIZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS.
P R E S E N T E.

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado:
“ESTUDIO SOBRE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA *in vitro* DE LA FRACCIÓN PdR-2 DE *Pleurotus djamor* Y EL ÁCIDO LINOLEICO COMERCIAL EN *Haemonchus contortus* que presenta la: **MVZ. XOCHITL ALONDRA PÉREZ MONTERO**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. FERNANDO IVÁN FLORES PÉREZ** y la Codirección de la **DRA. LILIANA AGUILAR MARCELINO**, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la alumna continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente

Por una humanidad culta

DR. VIRGINIO AGUIRRE FLORES

Comité Evaluador

C.i.p. Archivo

Av, universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México 62209

Tel (777)3297046, 3297000 Ext. 3304. fagropecuarias@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

VIRGINIO AGUIRRE FLORES | Fecha:2022-11-14 13:16:47 | Firmante

DfX+KTnNm4DqLH1MMXpDiXoFStvcGc25TtLSCHgJ3YodZ5miByJ9V2SBPqE1GB27qDym1WOJPE/7JsNiv/mnRFM/1tAuFGxKWp8kpvfxMTGxkhOm9lu5IKCr3PcBrrw8nvzr76/d5ijazSJNXIUzjn44ChryRE4rasu0LH1cMJD2U/d8WYVKAWAU6WD4xwzOvyU0PwVbjlHm27w+/Q47IQpl7f0YLvNOCdwD7u+3aFdsHpbx+jdRKKbdauEUgJPJW5lu8b+wyCFZwMWJdcBas1WXDC2glpmq3U57Bppnn1sGyY9kVZnefuxzDPV9FoaBAQUrF3GFEA3yzvZV2zkA==



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

[2FoRXgyaf](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/RWqWGldfguktEwcOhFib7a0u5Gduset>





Cuernavaca, Morelos, 09 de noviembre de 2022.

Asunto: Voto Aprobación de Tesis.

MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESENDIZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS.
P R E S E N T E.

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado:

“ESTUDIO SOBRE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA *in vitro* DE LA FRACCIÓN PdR-2 DE *Pleurotus djamor* Y EL ÁCIDO LINOLEICO COMERCIAL EN *Haemonchus contortus* que presenta la: **MVZ. XOCHITL ALONDRA PÉREZ MONTERO**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. FERNANDO IVÁN FLORES PÉREZ** y la Codirección de la **DRA. LILIANA AGUILAR MARCELINO**, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la alumna continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente

Por una humanidad culta

DR. JOSÉ ERNESTO SÁNCHEZ VÁZQUEZ

Comité Evaluador

C.i.p. Archivo

Av, universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México 62209

Tel (777)3297046, 3297000 Ext. 3304. fagropecuarias@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

JOSÉ ERNESTO SÁNCHEZ VÁZQUEZ | Fecha:2022-11-14 12:53:50 | Firmante

I0EbuXi/tnl9LkibPWXI+LS+sh9SQCoh+h6dlU0NoysfRnmalTFSZLOsuKlWF6F3qSLSXNr3D0V9Tmh3h7nWcGfLssdsnYbexaNJNB4Zua2b0X7NZXRZTRxiK7p+19y04pSc5glYH
njin1ANrpOT2Ei0iV86zdELtUFGK7rAhZTDAAdLO30sN9FwPT2/IIMTYSU2afI9vRFdCDIUik9QOGCV4vjQEuGcMYwkyWw/Krxx00vbS8s3UlibtO19gGIXMvBrcaAO1ULS/QgkQl5hZ
DD+5vrDxYX3tdEoEOr5Q6dpv7F7KpBLYc5Wls4WHOssUm3WNguTN7N0CsS8pXXKTReA==



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

[xZLefyHnV](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ETzrsAuDG6fSOC7aFeh7udtieNpKTHJV>





Cuernavaca, Morelos, 09 de noviembre de 2022.

Asunto: Voto Aprobación de Tesis.

MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESENDIZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS.
P R E S E N T E.

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado:
“ESTUDIO SOBRE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA *in vitro* DE LA FRACCIÓN PdR-2 DE *Pleurotus djamor* Y EL ÁCIDO LINOLEICO COMERCIAL EN *Haemonchus contortus* que presenta la: **MVZ. XOCHITL ALONDRA PÉREZ MONTERO**, mismo que fue desarrollado bajo mi dirección y la Codirección de la **DRA. LILIANA AGUILAR MARCELINO** y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la alumna continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente

Por una humanidad culta

DR. FERNANDO IVÁN FLORES PÉREZ

Comité Evaluador

C.i.p. Archivo

Av, universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México 62209

Tel (777)3297046, 3297000 Ext. 3304. fagropecuarias@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

FERNANDO IVAN FLORES PEREZ | Fecha:2022-11-15 21:24:15 | Firmante

aGZkWB/qACc+BvaFyPxiBnXWyncdpz1lFRBXjXyruxzKKH1IWtU/75mTsTX+ES9azSwPBBdwTaT1EpMvyKlywjZuwY+mf5t4QMAx76R3hKkNnrBgd5x5FkjA5Rjzl+xmTG4BXo5j
0KPaLmdP65eDMZyXLt4+43OZR/x2GIRMKww1LEzT+P5i3B74KgKbEDIQWRfBa1CqkTCFrswtmn5N8PF6Pwe6vKLaA1iCWISJERuAHGPKZmsA3T0mcNZn25mEq7BZs/e9 Hx6htZA9hwHiwF0EPXrktDXSpQKVjN3X6ZATGoAihKS/3qZ+yEG6aGnkw+eMQxQvV6qy0PIEQtpA==



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

[Dt5m8dGUc](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/V0f6oRC58JLWpXN0MXmFOA3XrKBJ6Moo>



