



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB)

Maestría en Biotecnología

**“Evaluación *in vitro* de extractos crudos de *Pleurotus* sp., y la participación de sus proteínas contra *Haemonchus contortus*”**

**T E S I S**

Que para obtener el título de:

**Maestro en Biotecnología**

Presenta

**I.B.T. Edgar Josué Cuevas Padilla**

Tutor: Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez

Co-tutor: Dra. Liliana Aguilar Marcelino

Cuernavaca, Morelos. México.

Junio 2019



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 21 Junio 2019

**COMITÉ DE REVISION DE TESIS**

- Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (Tutor)
- Dra. Liliana Aguilar Marcelino (Co Tutor)
- Dra. María Eugenia López Arellano
- Dra. Verónica Obregón Barboza
- Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Tesis:

"Evaluación in vitro de extractos crudos de *Pleurotus sp.*, y la participación de sus proteínas contra *Haemonchus contortus*"

Alumno que la presenta a revisión: **EDGAR JOSUE CUEVAS PADILLA**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

**VOTO**

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

ATENTAMENTE

  
DRA. MARIA EUGENIA LOPEZ ARELLANO



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 21 Junio 2019

**COMITÉ DE REVISION DE TESIS**

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (Tutor)  
Dra. Liliana Aguilar Marcelino (Co Tutor)  
Dra. María Eugenia López Arellano  
Dra. Verónica Obregón Barboza  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Tesis:

"Evaluación in vitro de extractos crudos de *Pleurotus sp.*, y la participación de sus proteínas contra *Haemonchus contortus*"

Alumno que la presenta a revisión: **EDGAR JOSUE CUEVAS PADILLA**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

**VOTO**

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

**ATENTAMENTE**

**DRA. LILIANA AGUILAR MARCELINO**



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 21 junio 2019

**COMITÉ DE REVISION DE TESIS**

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (Tutor)  
Dra. Liliana Aguilar Marcelino (Co Tutor)  
Dra. María Eugenia López Arellano  
Dra. Verónica Obregón Barboza  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Tesis:

"Evaluación in vitro de extractos crudos de *Pleurotus sp.*, y la participación de sus proteínas contra *Haemonchus contortus*"

Alumno que la presenta a revisión: **EDGAR JOSUE CUEVAS PADILLA**

Programa: **MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA**

**VOTO**

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

**ATENTAMENTE**

  
**DRA. VERONICA OBREGON BARBOZA**



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 21 junio 2019

**COMITÉ DE REVISION DE TESIS**

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (Tutor)  
Dra. Liliana Aguilar Marcelino (Co Tutor)  
Dra. María Eugenia López Arellano  
Dra. Verónica Obregón Barboza  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Tesis:

"Evaluación in vitro de extractos crudos de *Pleurotus sp.*, y la participación de sus proteínas contra *Haemonchus contortus*"

Alumno que la presenta a revisión: **EDGAR JOSUE CUEVAS PADILLA**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

**VOTO**

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

**ATENTAMENTE**

**DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA**



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a \_\_\_\_\_

**COMITÉ DE REVISION DE TESIS**

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (Tutor)  
Dra. Liliana Aguilar Marcelino (Co Tutor)  
Dra. María Eugenia López Arellano  
Dra. Verónica Obregón Barboza  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Tesis:

"Evaluación in vitro de extractos crudos de *Pleurotus sp.*, y la participación de sus proteínas contra *Haemonchus contortus*"

Alumno que la presenta a revisión: **EDGAR JOSUE CUEVAS PADILLA**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

**VOTO**

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

ATENTAMENTE

DR. VICTOR MANUEL HERNANDEZ VELAZQUEZ

## **i. Reflexión**

“No existe método de control biológico más efectivo, que aquel implementado por la propia naturaleza. Cualquier entidad biológica en el planeta, desde los microscópicos micoplasmas hasta las criaturas más majestuosas como la ballena azul o el gigantesco hongo de miel de Oregon, todos estamos supeditados a contrapartes que regulan nuestra población y se esfuerzan por mantener nuestro entorno dentro de un proceso de homeostasis dinámica. Esto no es crueldad, es sólo la propia naturaleza diciéndonos que ninguna especie puede poseer todo para sí misma. De la misma manera en que el ser humano combate plagas para garantizar su sustento, la naturaleza reclamará lo propio; y en este sentido, sería conveniente que sea el propio hombre quien aplique mecanismos precautorios de control, fuera del contexto de la muerte y la violencia”.

Edgar Josué Cuevas Padilla.

## **ii. Dedicatoria**

El presente trabajo está dedicado a la compañera de mi vida, quién se ha mantenido como un pilar de nuestra familia y quién con su amor y cariño me ha brindado fortaleza cuando lo he requerido. De la misma manera, la dedicatoria sea extendida a mi querido hijo, quien es una luz de esperanza en nuestra vida y que sólo nos regala amor a través de su mirada y su sonrisa.

Para:

**Paloma Rivera Lara**

**y**

**Diego Yunuen Cuevas Rivera**



### **iii. Agradecimientos**

Al CONACyT por la beca nacional otorgada a un servidor.

Al personal administrativo y de investigadores del CEIB-UAEM quien me ayudaron a forjar conocimientos y apoyo para el desarrollo del presente. En especial a mi tutor Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez por toda su entrega y paciencia.

Al personal administrativo y de investigadores del INIFAP-SAI quienes me recibieron muy cálidamente y con quienes he desarrollado mis habilidades en la investigación. Al Dr. Pedro Mendoza de Gives líder del departamento de Helminología por su atención y prestancia, a la Dra. Liliana Aguilar Marcelino por su apoyo y dirección; así como también a la Dra. María Eugenia López Arellano por sus comentarios siempre tan atinados para mejorar el presente proyecto. Asimismo, quiero agradecer a todos mis compañeros del laboratorio de Helminología que aunque su presencia haya sido fugaz o no, he aprendido mucho.

A mis padres José Félix Cuevas Albavera y Rosa Ma. Padilla Moreno quienes me han hecho la persona que soy y quienes siempre han estado dispuestos a ayudar. A mis suegros Eloy Eligio Rivera Campos y Inés Lara Martínez quienes me recibieron muy bien como parte de su linda familia y en quienes me han enseñado a valorar la humildad y el trabajo arduo. A toda mi extensa familia porque siempre son un descanso para mi espíritu.

#### iv. Resumen

Las proteínas han ganado un interés creciente para la formulación de antihelmínticos con nuevos mecanismos de acción. Los avances logrados con la proteína Cry5B y el potencial de las lectinas fúngicas contra nematodos parásitos y otras plagas, han logrado estimular la investigación de trabajos enfocados a evaluar extractos proteicos de diversas fuentes naturales contra especies parásitas. En hongos comestibles *Pleurotus* spp., los extractos crudos de *P. ostreatus* y *P. eryngii* fueron notificados con actividad contra huevos del nematodo parásito *Haemonchus contortus*. Entre los compuestos bioactivos, se mencionaron proteínas solubles (13-150 kDa) visualizadas mediante geles de poliacrilamida. Debido a ello, en el presente trabajo se realizó una búsqueda en cinco especies de *Pleurotus* (*P. cornucopiae*, *P. djamor*, *P. eryngii*, *P. ostreatus* y *P. pulmonarius*) para identificar el extracto crudo con mayor actividad contra huevos de *H. contortus*. *P. pulmonarius* con 81.2% de IEH, reveló simultáneamente un efecto letal contra L1 eclosionadas. Los bioensayos realizados contra L3 y L4, indicaron un efecto paralizante en estadios con alimentación activa como L4 (51% PL). Los contrastes de actividad paralizante entre el extracto crudo, extractos inactivados y un extracto hidroalcohólico, sugirieron la participación de compuestos de naturaleza proteica como compuestos activos mayoritarios; demostrando el potencial nematicida de posibles proteínas de *P. ostreatus* contra larvas de especies parásitas.

## v. Índice de contenido

i. Reflexión personal	ii
ii. Dedicatoria	iii
iii. Agradecimientos	iv
iv. Resumen	v
v. Índice de contenido	vi
vi. Índice de figuras	viii
vii. Índice de tablas	ix

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
------------------------	----------

<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>2</b>
------------------------	----------

2.1 Nematodos: su biología y contribución al ecosistema	4
2.1.1 Problemas con nematodos parásitos transmitidos por el suelo	
2.1.2 Nematodos y la ovinocultura	
2.2 <i>Haemonchus contortus</i> , un nematodo hematófago	8
2.2.1 Taxonomía	
2.2.2 Ciclo biológico	
2.3 Control de helmintos y nematodos parásitos	14
2.4 Los hongos como fuente de nuevos antiparasitarios	15
2.4.1 Hongos basidiomicetos	
2.4.2 <i>Pleurotus</i> sp.	
2.4.2.1 Actividad nematófaga como rasgo común del género	
2.5 Proteínas fúngicas contra nematodos	21
2.5.1 Proteínas de <i>Pleurotus ostreatus</i> con actividad biológica contra nematodos	

<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>25</b>
-------------------------	-----------

<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>26</b>
---------------------	-----------

<b>5. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>27</b>
----------------------------	-----------

5.1 Objetivos particulares

<b>6. METODOLOGÍA</b>	<b>28</b>
-----------------------	-----------

6.1 Producción y preparación de germoplasma	28
6.1.1 Producción del micelio de <i>Pleurotus</i> sp.	
6.1.2 Cosecha de micelio de <i>Pleurotus</i> sp.	
6.1.3 Huevos de <i>Haemonchus contortus</i>	

6.1.4 Larvas infectantes de <i>H. contortus</i>	
6.1.5 Desenvaine de larvas infectantes	
6.1.6 Cultivo para obtención de larvas histiotrópicas (L4)	
6.2 Extracción de proteína	34
6.2.1 Preparación y esterilización de extracto crudo	
6.2.2 Cuantificación de proteínas solubles	
6.2.3 SDS-PAGE 5-12%	
6.2.3.1 Tinción con azul de Coomassie	
6.3 Bioensayos	37
6.3.1 Diseño experimental	
6.3.2 Inhibición de la eclosión	
6.3.3 Actividad letal contra larvas	
6.3.4 Análisis de datos experimentales	
6.4 Inactivación de proteínas	39
6.4.1 Inactivación por calor	
6.4.2 Inactivación por el uso de enzimas (tripsina)	
6.4.3 Inactivación por el uso de inhibidores (PMSF)	
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>41</b>
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>49</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>54</b>
<b>10. PERSPECTIVAS</b>	<b>55</b>
<b>11. REFERENCIAS</b>	<b>56</b>

## vi. Índice de figuras

1. Distribución de especies de nematodos en la naturaleza	4
2. Ciclo biológico de <i>Haemonchus contortus</i>	13
3. Larva infectante de <i>Haemonchus contortus</i> (L3)	13
4. Ciclo biológico de hongos basidiomicetos	16
5. Formación de toxocistos en <i>Pleurotus</i> subgen. <i>coremiopleurotus</i>	19
6. Cultivo madre en PDA	29
7. Proceso de obtención y limpieza de huevos	30
8. Obtención de larvas L3 limpias	32
9. Vaina de una L3	33
10. Estudio de la actividad inhibitoria de extracto crudo de hongos <i>Pleurotus</i> sp.	42
11. Perfil proteínico de los extractos crudos de <i>Pleurotus</i> sp.	42
12. Estudio de la actividad inhibitoria del EPP mantenido en congelación	43
13. Actividad del extracto crudo de <i>P. pulmonarius</i> contra larvas infectantes	44
14. Actividad antagónica de EPP y EPP inactivado por calor, por inhibidor y por tripsinización contra L4 de <i>H. contortus</i>	45
15. Perfil proteínico de los tratamientos de EPP crudo e inactivados	46
16. Comparación de actividad biológica entre el extracto crudo y el extracto hidroalcohólico de <i>P. pulmonarius</i>	47
17. Perfil proteínico del EPP y EHA-PP	48

## vii. Índice de tablas

1. Taxonomía de <i>Haemonchus contortus</i>	11
2. Clasificación taxonómica de los hongos <i>Pleurotus</i> sp.	17
3. Preparación de geles de poliacrilamida en gradiente	36
4. Inhibición de la eclosión de huevos del nematodo <i>Haemonchus contortus</i> por el extracto crudo del hongo <i>P. pulmonarius</i> cepa ECS-0190	44

## **1. Introducción**

Los nematodos parásitos de plantas y animales, están relacionados con un entorno de escasez alimentaria y pobreza. En actividades primarias, como la ovinocultura, las enfermedades generadas por nematodos gastrointestinales (NGI) representan uno de los problemas más complejos y persistentes de las áreas productivas; manifestándose en un bajo rendimiento, morbilidad y muerte de los animales. Debido a ello, anualmente se destinan arriba de \$190 mil millones de pesos mexicanos en adquisición de productos antihelmínticos (AH) a nivel mundial. Éstos AH incluyen compuestos químicos como los benzimidazoles (despolimerizadores de microtúbulos), imidazotiazoles (agonistas nicotínicos) y las lactonas macrocíclicas (agonistas de canales iónicos); mismos que debido a su amplio espectro de acción y disponibilidad, continúan siendo el pilar de la terapia química en animales. Por lo tanto, el uso de dichos productos se hace indispensable con el fin de mantener la salud en los rebaños y una productividad aceptable; aunque puede llegar a ser insostenible, debido al incremento del costo de producción.

Los programas de desparasitación en rumiantes habían estado basados exclusivamente en la aplicación masiva de los AH, los cuales fueron introducidos con éxito desde la década de los 1960`s. Este tipo de programas intensivos, aunados con malas prácticas en el uso de los productos, baja tecnificación en los sistemas productivos y desregulación en la venta de AH, originaron problemas en campo como la llamada resistencia antihelmíntica (RA). La RA se ha definido como la capacidad heredable del parásito para sobrevivir dosis de AH que normalmente era letal en parásitos de la misma especie y estado; por lo que la efectividad del AH utilizado decrece (p.e. una reducción del conteo de huevos en heces <95%, post-tratamiento). La RA es un problema global que al disminuir la eficacia de los AH, compromete la salud y bienestar animal, la rentabilidad del negocio y eventualmente se convierte en un peligro para el entorno y la salud pública. Además, existen registros manifestando resistencia a más de un tipo de AH (con mecanismos de acción diferentes), con consecuencias preocupantes sobre todo en especies vulnerables a enfermedades parasitarias, como las ovejas y cabras.

*Haemonchus contortus*, un NGI, está considerado entre los principales agentes causales de gastroenteritis en los rebaños ovinos y es el principal problema de regiones tropicales y subtropicales del planeta (Waller y Chandrawathani, 2005). Además, se ha logrado destacar del resto, por su patogenicidad y capacidad de resistir a todos los AH probados en laboratorio, haciéndolo un modelo prominente en estudios sobre mecanismos de acción y generación de resistencia a los AH (Gilleard, 2013; Kotze y Prichard, 2016; Harder, 2016; Sangster et al., 2018). De la misma manera, ha sido importante en la evaluación de actividad biológica y descubrimiento de los AH semi-sintéticos de uso animal más actuales Emodepside, 2007 y Derquantel, 2012 (Epe y Kaminsky, 2013; Geary et al., 2016).

Ante este panorama, y el promisorio éxito obtenido de los AH semisintéticos derivados de hongos (Derquantel y Emodepside); el interés científico se ha visto estimulado para enriquecer el inventario de compuestos, explorando el vasto catálogo de hongos con énfasis hacia los hongos nematófagos. Los hongos son fuente de compuestos naturales con 200 compuestos tóxicos para nematodos. Metabolitos secundarios como terpenoides (p.e. Isovelleral, oligosporon), compuestos alifáticos (p.e. ácido linoleico, ácido acético), alcaloides (p.e. fenoxazona, paraherquamida), compuestos aromáticos simples (p.e. 4-anisaldehído, alcohol anisílico), compuestos heterocíclicos con oxígeno y/o benceno (p.e. ácido 5-metilfuran-3-carboxílico, nafuredin), péptidos (p.e. Omfalotina A, PF1022A), etc.; así como algunas proteínas (p.e. lectinas, colagenasas, serin proteasas, quitinasas, proteínas pequeñas abundantes en cisteína) se consideran importantes factores de virulencia de los hongos. Hasta la fecha, 23 especies del género *Pleurotus* han presentado actividad nematófaga, tres de las cuales han sido útiles para identificar nueve compuestos bioactivos: 1) Cheimonophyllon E y 2) 5-hydroxymethyl-furancarbaldehyde en *P. eryngii* anteriormente descrito como *P. ferulae*; 3) ácido trans-2-decenedioico en *P. ostreatus* y 4) ácido S-coriólico, 5) ácido linoleico, 6) p-anisaldehído, 7) p-anisil alcohol, 8) 1-(4-methoxyphenyl)-1,2-propanediol, 9) 2-hydroxy-(4'-methoxy)-propiophenone en *P. pulmonarius*. En el caso de *P. cornucopiae* las proteínas tamavidinas y serin proteasas de *P. ostreatus*, se han manifestado con actividad letal contra nematodos de vida libre (*C. elegans* y *Panagrellus* sp., respectivamente).



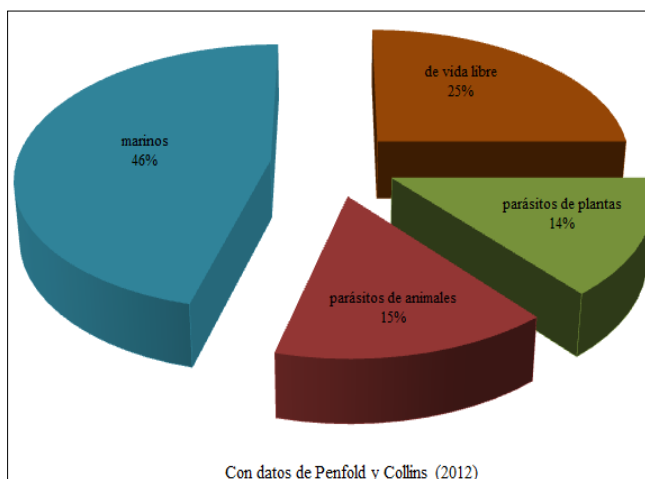
A pesar de que son escasos los estudios utilizando nematodos parásitos como indicadores biológicos de actividad, se han notificado especies como *P. ostreatus* y *P. eryngii* con actividad nematicida contra larvas infectantes (L3) de *H. contortus* con 97.2 y 98.1%, respectivamente (*in vitro*). Este hecho motivó estudios más rigurosos tanto de metabolitos secundarios como de extractos crudos de *Pleurotus* contra ésta especie parásita. A la fecha, los metabolitos secundarios más efectivos de *Pleurotus* sp. son compuestos lipídicos (ácidos grasos y terpenoides), compuestos aromáticos simples, furanos y azúcares. Siendo éstos últimos los compuestos más hidrosolubles, obtenidos generalmente por medio de macerados hidroalcohólicos. Por otro lado, los extractos crudos del micelio de *Pleurotus* sp., han revelado tener actividad inhibitoria contra huevos de *H. contortus*; haciendo hincapié, sobre la existencia de proteínas con funciones implicadas en la actividad contra los huevos.

En el presente estudio, se evaluará la actividad inhibitoria del extracto crudo de cinco especies de *Pleurotus* (*P. cornucopiae*, *P. djamor*, *P. eryngii*, *P. ostreatus* y *P. pulmonarius*) contra huevos de *H. contortus*. De la misma manera, se realizará el estudio de la actividad larvicida del extracto crudo seleccionado contra estadios infectantes (L3) e histiotrópicos (L4). El trabajo se complementará con la confirmación, o no, de la participación de las proteínas en la actividad larvicida del extracto crudo; así como la presencia de actividad proteica seleccionada y pruebas químicas contra metabolitos de interés.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Nematodos: su biología y contribución al ecosistema

Los nematodos se encuentran entre los animales más numerosos de la Tierra y conforman el segundo filo más diverso del reino con 25,043 especies descritas hasta el año 2013. El número de especies conocidas, sin embargo, no representa más de la cuarta parte de las  $0.1-100 \times 10^6$  de especies que se han calculado en todo el planeta (Meldal et al., 2007; Zhang, 2013). Ubicuos en la naturaleza, los nematodos constituyen nichos ecológicos con poblaciones que llegan hasta  $1 \times 10^8$  de individuos por  $m^2$  de suelo (Chen et al., 2004; Mekonen et al., 2017); pudiéndose diferenciar, de acuerdo a su habitat, dos grandes grupos: 1) nematodos terrestres y 2) nematodos marinos. Los nematodos terrestres, a los cuales nos vamos a referir en el presente proyecto, son en realidad organismos acuáticos; por lo que la humedad en su microambiente es esencial para su sobrevivencia. De ésta manera, los nematodos terrestres viven en ambientes semiacuáticos, embebidos en películas de agua que rodean las partículas de suelo; debido a ello, es que hay posibilidad de encontrarlos en cualquier hábitat que provea una mínima fuente de carbono orgánico y condiciones mínimas para su supervivencia, incluso dentro de regiones desérticas (Freckman et al., 1975; Song et al., 2017). Las especies terrestres de nematodos se componen aproximadamente de 25% de nematodos de vida libre, 15% de nematodos parásitos de animales y 14% de nematodos parásitos de plantas (Bongers y Ferris, 1999; Penfold y Collins, 2012; Song et al., 2017).



**Figura 1. Distribución de especies de nematodos en la naturaleza.** Se muestran porcentajes obtenidos con datos publicados por Bongers y Ferris, 1999; Penfold y Collins, 2012; Zhang, 2013 y Song et al., 2017.

De manera general, los nematodos presentan una apariencia común en su sección transversal: son organismos con forma cilíndrica, alargada y delgada (Gunn y Pitt, 2012) con ambos extremos convergentes. Son considerados metazoarios pseudo-celomados no segmentados, taxonómicamente incluidos en el filo “Nematoda”. A pesar de ello, debido a su apariencia vermiforme, los nematodos se incluyen en el grupo de los “Helmintos”; una clasificación médica complementaria, no taxonómica, pero ampliamente utilizada. Es necesario aclarar, que el grupo de los Helmintos no constituye un grupo monofilético; pues se incluyen metazoarios de cuatro filos distintos que no están relacionados genealógicamente: Platelminetos (gusanos planos), Acantocéfalos (cabeza espinosa), Nematodos (gusanos redondos) y Anélidos (gusanos segmentados).

En suelo, los nematodos cumplen importantes funciones biológicas que abarcan desde la mineralización de compuestos orgánicos, el mejoramiento de las propiedades físicas del suelo, incremento en la disponibilidad de nutrientes (N, P, K), hasta la distribución de biomasa dentro de las plantas; además, tienen potencial para ser utilizados como indicadores ambientales y en programas de control biológico contra plagas de cultivos agrícolas (Neher, 2001; Karssen y Moens, 2006; Gebremikael et al., 2016; Song et al.; 2017; Mekonen et al., 2017).

### **2.1.1 Problemas con nematodos parásitos transmitidos por suelo**

Algunas especies terrestres de nematodos, suponen un riesgo potencial para la rentabilidad de los sistemas productivos y sustentabilidad alimentaria del hombre (Nicol et al., 2011; Hassan et al., 2013; Roeber et al., 2013; Cable et al., 2017). En este sentido; los nematodos parásitos, tanto de plantas y animales, destacan del resto por las repercusiones en actividades primarias del ser humano (Bird y Opperman, 2009). Se estima que los nematodos parásitos de plantas son responsables de la destrucción de al menos el 12.3% de la producción global de alimentos, que asciende a pérdidas económicas de más de \$3 billones de pesos mexicanos al año, a nivel mundial (Hassan et al., 2013). Nicol y colaboradores (2011) notifican que la destrucción dentro de latitudes tropicales y sub-tropicales es mayor, con porcentajes de al menos 14.6%.

Por otro lado, en el sector pecuario, existe un incremento en el costo productivo debido a tratamientos y contención de enfermedades parasitarias por nematodos, que se calcula en más de \$190 mil millones de pesos anuales a nivel mundial, sólo para el caso de la ovinocultura y sin tomar en cuenta las pérdidas debidas a la manifestación de la enfermedad (Roeber et al., 2013). En México, el impacto económico negativo de las enfermedades parasitarias en ganado bovino, se han calculado en más de \$25 mil millones de pesos anuales, determinando que los principales efectores del daño fueron principalmente endoparásitos como los nematodos gastrointestinales (NGI), que se identificaron en muestras obtenidas de rebaños mantenidos en regiones con latitudes tropicales y sub-tropicales del país (Rodríguez-Vivas et al., 2017).

### **2.1.2 Nematodos y la ovinocultura**

La ovinocultura o crianza productiva de ganado ovino (*Ovis aries*) es una actividad pecuaria que además de generar un ingreso económico, representa disponibilidad de alimento para sectores marginales de la población. En la República Mexicana, como en el resto del mundo, la producción ovina se desarrolla primordialmente bajo sistemas de pastoreo en praderas o traspatio (Partida et al., 2013). De esta manera, se aprovechan los recursos forrajeros disponibles minimizando costos y mejorando cualidades organolépticas de la carne. No obstante, una de las desventajas de estos sistemas de crianza es que la rentabilidad del negocio se vuelve dependiente de múltiples factores que afectan la productividad de los hatos o rebaños ovinos, como son: la cantidad, calidad y tipo de vegetación accesible para los rumiantes, condiciones climáticas de la región de pastoreo, la presencia o ausencia de depredadores naturales, y la prevalencia de patógenos en la zona, entre otros.

Entre los patógenos que afectan la salud, bienestar y rendimiento de la productividad de los ovinos se menciona a los parásitos, en especial aquellos considerados endoparásitos (especies que parasitan el interior de un hospedador); debido a que tienen mayor prevalencia en latitudes templadas, tropicales y subtropicales del mundo (Rodríguez-Vivas et al., 2017; González et al., 2011).

Las enfermedades ocasionadas por endoparásitos son responsables de las mayores pérdidas económicas en la ovinocultura (siendo de tipo directo representada por la muerte de los animales jóvenes y/o de tipo indirecto manifestándose clínicamente por diarreas persistentes, anemia y desnutrición; dando como resultado un retraso en el crecimiento de los animales jóvenes y disminución en la producción de carne y leche en animales adultos) y son consideradas un problema sanitario en los hatos ovinos alrededor del mundo (Henrioud, 2011; Liébano, 2011; Waller y Chandrawathani, 2013). Los endoparásitos como los nematodos, trematodos y cestodos, afectan principalmente el tracto gastrointestinal de los rumiantes, ocasionando daños histológicos y cuadros anémicos en animales susceptibles (Besier et al., 2016a). Los parásitos más patógenos del tracto gastrointestinal de los rumiantes son los helmintos, y representan un riesgo a la producción zootécnica, salud pública y medio ambiente. Las enfermedades causadas por helmintos como el trematodo *Fasciola* sp., el cestodo *Moniezia* sp., el nematodo pulmonar *Dictyocaulus* sp., y los NGI's como *Teladorsagia/Ostertagia* sp., *Cooperia* sp., *Trichostrongylus* sp., y *Haemonchus* sp., son los de mayor impacto económico en la ganadería mundial.

De hecho, las parasitosis por infecciones con NGI en pequeños rumiantes, además de provocar severos daños en materia de rentabilidad, salud y bienestar animal; pueden llegar a causar la muerte de animales infectados (Angulo-Cubillán et al., 2007; Roeber et al., 2013; Hoste et al., 2016; Besier et al., 2016a). Se estima que más del 80% de la población mundial es afectada por los helmintos, disminuyendo la producción pecuaria drásticamente y representando un grave problema de salud (Torgerson y Macpherson, 2011). Para Partida y su grupo (2013), *H. contortus* es el parásito causante de mayores pérdidas económicas en los ovinos y mencionan que su potencial biótico es magnificado en regiones con zonas de clima cálido o durante la temporada calurosa de zonas de climas moderados. Aunque, en zonas semiáridas, también son responsables de importantes pérdidas.

## **2.2 *Haemonchus contortus*, un nematodo hematófago**

El nematodo *H. contortus* es uno de los NGI de mayor relevancia en la ovinocultura debido a su patogenicidad, amplia distribución en regiones templadas-cálidas, tropicales y subtropicales del mundo; además, por presentar un gran potencial biótico (Vázquez et al., 2004; Waller y Chandrawathani, 2005; Rinaldi et al., 2015; Emery et al., 2016; Besier et al., 2016b). Su hábito hematófago le lleva a consumir, por parásito, hasta 50  $\mu\text{L}$  de sangre diariamente (Angulo-Cubillán et al., 2007) provocando daños histológicos y alteraciones en el equilibrio hematopoyético del hospedador, cuya magnitud es dependiente de la cantidad de parásitos infectantes, su virulencia y las condiciones de susceptibilidad del ovino (edad, estado inmunológico, nutricional, genético y condiciones de manejo). Su prevalencia en suelos infestados se debe principalmente a que las hembras son especialmente fértiles, eliminando de 5,000 a 10,000 huevos por día, cada una (Liéban, 2011). Los huevos que son excretados junto a las heces del ovino componen la fase pre-parasítica del nematodo y marca el inicio de una corta travesía en el ambiente.

Los huevos de *H. contortus* son fecundados en hembras adultas del nematodo, posterior a la copulación con un macho de la especie. Los huevos tienen forma ovoide, con extremos de curvaturas y polos dispares. El tamaño promedio de un huevo es de 70-79  $\mu\text{m}$  en su eje longitudinal y de 45-49  $\mu\text{m}$  en el transversal. Generalmente, dentro de las hembras se pueden encontrar huevos con hasta cuatro blastómeros, mismos que son ovipositados en el interior del hospedero infectado. En el estómago del hospedero, el desarrollo embrionario continúa hasta una etapa con 11 blastómeros, y en casos extremos es posible encontrar huevos en fase morular. Los huevos liberados con las heces, no suelen estar más allá de la etapa morular; sugiriendo que el oxígeno es necesario para la síntesis embrionaria. El huevo continúa desarrollándose en el ambiente, encontrando huevos en fase renacuajo y etapas larvales embrionarias a partir de las 6 y 10 h, respectivamente. En medios líquidos, los huevos eclosionan normalmente antes de 18 h de incubación (Veglia, 1916).

Las larvas eclosionadas (L1) son el inicio de una fase “tipo vida libre”, con un comportamiento tipo rhabditoide. Las L1 varían en tamaño, con un promedio de 345  $\mu\text{m}$  de longitud por 17  $\mu\text{m}$  de grosor en la parte del esófago. La forma del cuerpo es cilíndrica, disminuyendo gradualmente en grosor desde la base del esófago hasta la cola. Esta forma es típica y es una manera de distinguirla del segundo estadio. La L1 tiene una apertura bucal de 7  $\mu\text{m}$  de diámetro externo, unida a un esófago de forma rhabditoide (con presencia de bulbo), con el cual succiona bacterias y *detritus* que le sirven de alimento. El esófago está conectado con el intestino-quilo compuesto por 8 células de forma triangular que llegan hasta el recto. La L1, se alimenta a desde la primer hora de haber eclosionado y lo hace hasta entrar en un estado letárgico dentro de las 10-12 h posteriores a la eclosión, donde las larvas permanecen inmóviles. En este estado es común confundirlas con larvas muertas; debido a que no reaccionan a estímulos como agitación del medio líquido o exposición a la luz. En este letargo de 8 a 10 h de duración, La L1 presenta adaptaciones morfológicas (acortamiento del esófago, pérdida de espacio intestinal, aparición de núcleo celular en las células intestinales, la formación de una nueva epidermis y un cambio en el tamaño de la larva), hasta que vuelve a la actividad y logra desprenderse de la epidermis vieja, proceso conocido como ecdisis (Veglia, 1916).

La L2 inicia su etapa desde que sale del primer letargo. En esta etapa se observa una longitud promedio de 500  $\mu\text{m}$  y un diámetro longitudinal uniforme desde el esófago hasta la cola. El esófago presenta un bucle, la epidermis exhibe líneas laterales bien formadas, sombreadas y el extremo de la cola presenta forma de gancho. La alimentación es activa, como el estadio anterior y la larva se alimenta hasta un segundo período de letargo que inicia aproximadamente a las 40 h de la primera ecdisis. En esta segunda etapa de letargo, los cambios morfológicos son acompañados de una segunda ecdisis que duran entre 8-12 h y son dependientes de condiciones favorables del medio. La principal diferencia entre la segunda ecdisis y la primera, es que en la segunda no hay un desprendimiento total de la epidermis; quedando anclada a la larva en forma de vaina (Veglia, 1916; Liébano et al., 2011).

La morfología de la larva infectante (L3) de *H. contortus* se compone por un cuerpo no segmentado, cilindroide, simétrico, alargado y de proyección convergente en ambos extremos. La larva L3 mide aproximadamente 734  $\mu\text{m}$ , es extremadamente móvil y está protegida por una vaina semipermeable compuesta por lípidos, colágeno y quitina, que le brinda soporte y protección contra inclemencias de su entorno (factores ambientales como frío, calor, radiación, compuestos químicos, etc.). La L3 posee un esófago tipo filariforme con 16 células intestinales bien diferenciadas. El extremo anterior y posterior de este estadio larval sirve de base para exámenes morfométricos en la identificación y diferenciación entre nematodos parásitos (ver figura 3A). La larva en este estadio, no se alimenta y vive de reservas energéticas de los estadios previos. Se sabe que la supervivencia de la L3 en el medio ambiente, llega hasta los 21 d; por lo que el éxito de su sobrevivencia se basa en el hecho de alojarse en un hospedero. La L3 ingerida por el hospedador se libera de su vaina en el rumen y tarda en llegar al orificio omaso-abomaso alrededor de 10-20 min después de ingerida. Al llegar al abomaso inicia una etapa tisular o histotrópica y se transforma en L4; ésta penetra las criptas de las glándulas gástricas, se alimenta y crece. Posteriormente pasa a la mucosa abomasal, la abandona y se aloja en el lumen del abomaso mudando una vez más para transformarse en L5 la cual se desarrolla sin mudas posteriores hasta diferenciarse sexualmente como nematodo macho (~10-20 mm) o hembra (~18-30 mm). Imagen adaptada de Cuevas (2013); información, Liébano (2011).

Los nematodos adultos de esta especie son fáciles de identificar por su localización específica en el sitio de infección (abomaso) y su gran talla (2-3 cm). Además, las hembras muestran un aspecto característico tipo “poste de peluquero” (por su traducción del inglés “barber’s pole”); que se debe al contraste rojo y blanco que hay entre sus ovarios y el intestino lleno de sangre que se entrelazan en espiral a lo largo de su cuerpo. La cavidad bucal es pequeña y contiene un estilete (pequeño diente tipo lanceta) que utiliza para ocasionar daños histológicos y succionar la sangre del hospedero. El cuerpo anterior posee papilas cervicales prominentes. La vulva usualmente se encuentra protegida por una solapa cuticular, la cual puede tomar formas variadas. En el caso de los nematodos machos, los lóbulos laterales de la Bursa son grandes, mientras el rayo dorsal es pequeño y asimétrico (Taylor et al., 2016).



### 2.2.1 Taxonomía

La sistemática de los nematodos esta inherentemente propensa a controversia e inestabilidad (De Ley y Blaxter, 2002); sin embargo, el sistema de clasificación presentado a continuación se basó en literatura taxonómica reciente (Taylor et al., 2016). En este sistema, los géneros y especies de la clase Secernentea conforman 16 familias, las cuales pueden quedar convenientemente divididas en dos grupos: (1) nematodos bursados (Trichostrongyloidea, Strongyloidea, Ancylostomatoidea, Metastrongyloidea) y (2) nematodos no bursados (Rhabditoidea, Ascaridoidea, Dioctophymatoidea, Oxyuroidea, Spiruroidea, Filarioidea, Trichuroidea, Trichinelloidea). Como podemos apreciar en la tabla, *H. contortus* pertenece a la superfamilia Trichostrongyloidea.

**Tabla 1. Taxonomía de *Haemonchus contortus***

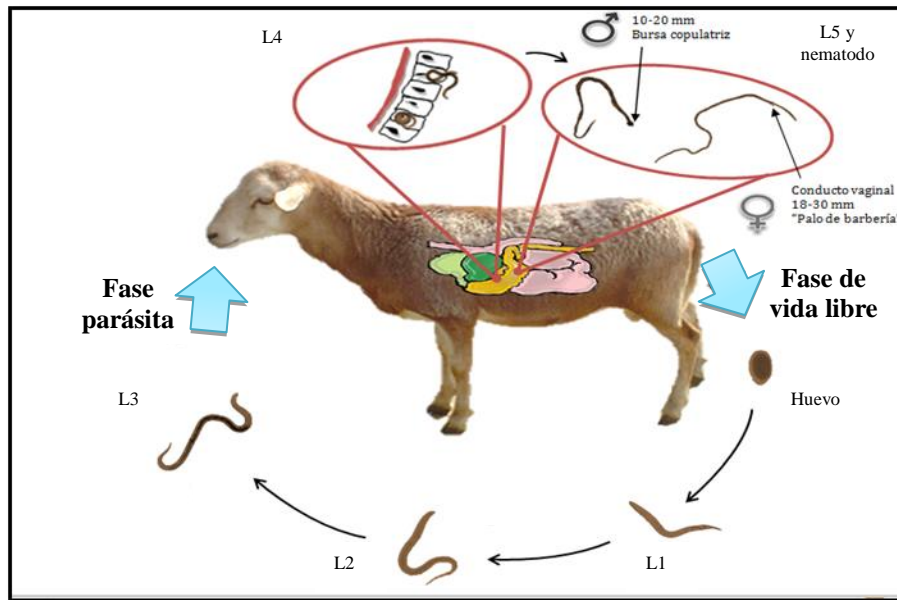
<b>Reino</b>	Animalia
<b>Filo</b>	Nematoda
<b>Clase</b>	Secernentea
<b>Orden</b>	Strongylida
<b>Sub-orden</b>	Strongylina
<b>Superfamilia</b>	Trichostrongyloidea
<b>Familia</b>	Trichostrongylidae
<b>Subfamilia</b>	Haemonchinae
<b>Género</b>	Haemonchus
<b>Especie</b>	<i>H. contortus</i>

Fuente: Taylor et al., 2016

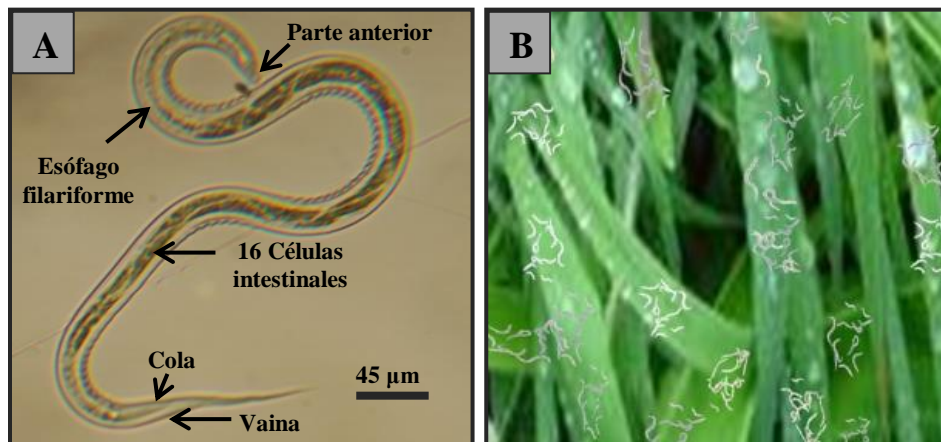
### 2.2.2 Ciclo biológico

El ciclo biológico de *H. contortus* es monoxeno, por lo que no necesita hospedadores intermediarios. Infecta preferencialmente rumiantes; siendo los llamados pequeños rumiantes, como cabras y ovejas, los hospederos más susceptibles a la infección. A pesar de que se han notificado algunos otros mamíferos como hospederos accidentales (entre ellos, humanos, elefantes, etc.), las larvas son vulnerables a su eliminación y es difícil que completen su ciclo biológico. El ciclo puede ser dividido en dos etapas o fases de desarrollo: una primer fase no parásita (de vida libre) donde el nematodo se comporta como un nematodo de vida libre, y transcurre los estadios de huevo (en fase morular o previa), L1, L2 y L3. La fase de vida libre se realiza en 7d bajo condiciones favorables de temperatura y humedad. La segunda fase es parásita obligada por lo que la L3 ingerida por el rumiante, se desenvaina en el rumen y migra a través de los diferentes compartimentos estomacales hasta refugiarse en el abomaso o estómago verdadero, sitio en el que se lleva a cabo la evolución a L4 o larva histiotrópica, la cual comienza la maduración y diferenciación sexual y surgen los nematodos adultos, hembras o machos. El ciclo biológico completo dura alrededor de 28 días: siete días para la fase de vida libre y 21 días para la fase parásita (ver figura 2).

En condiciones de humedad (80 a 100%) y temperatura (18 a 35 °C) se suele favorecer el desarrollo de los estadios libres del nematodo (Vázquez et al., 2004; González, 2007; Liébano, 2011). Cabe destacar que la precipitación pluvial, luminosidad y tipo de pasto o follaje pueden afectar o favorecer la sobrevivencia de las poblaciones larvarias en el ambiente. La temperatura óptima de las L3 de *H. contortus* oscila entre los 15 y 30°C, mientras que con una humedad en suelo del 40 al 60% siempre se encontrarán activas (Liébano et al., 1998; Liébano, 2011). Las L3 activas son altamente móviles y presentan ciertos tropismos que le ayudan a concluir su ciclo biológico dentro de un hospedero rumiante: un tropismo negativo a la luz intensa, que le ayuda a buscar refugio en el nano clima del subsuelo o en el tallo del follaje; y un tropismo positivo a la luz tenue y humedad, que lo guía habitualmente a subir verticalmente a lo alto de los pastos donde suele encontrarse en gotas de rocío durante la mañana y la tarde (ver figura 3B). Este hábito favorece la probabilidad de infección en los rebaños que usualmente acostumbran pastar en condiciones similares.



**Figura 2. Ciclo biológico de *Haemonchus contortus*.** El ciclo monoxeno se dividió en dos fases importantes para el nematodo parásito: 1). Fase de vida libre: que inicia con huevos liberados al ambiente y termina con la larva infectante L3. Etapa con duración aproximada de 7 d.; y 2). Fase parásita: que inicia con la ingestión de la L3 en un hospedero rumiante, hasta la generación de huevos por copulación de nematodos machos y hembras. Etapa con duración aproximada de 21 d.



**Figura 3. Larva infectante de *Haemonchus contortus* (L3).** La imagen A muestra una L3 con algunas de sus características morfológicas. En la imagen B se muestra de manera ilustrativa cómo las L3 migran e infestan el pasto, exponiéndose a la ingestión por un rumiante. Imagen B, tomada de Liébano (2004).

### **2.3 Control de helmintos y nematodos parásitos**

El uso de antihelmínticos comerciales para controlar las nematodiasis, en rumiantes, ha sido el método preferido en los distintos sitios de producción (Miller y Horohov, 2006); ya que suelen ser costeables, efectivos y gozan de tener amplio espectro de acción. La gama comercial de los formulados antihelmínticos para rumiantes están comprendidos en cinco grupos: benzimidazoles, imidazotiazoles, salicilanílicos, nitrofenoles y lactonas macrocíclicas. De estos grupos, los benzimidazoles y las lactonas macrocíclicas son los antiparasitarios más empleados en ovinos (Cuéllar, 2009).

Sin embargo, el uso masivo y constante de estos productos químicos han generado el problema mundial conocido como RA (Waller et al., 1996; Torres-Acosta et al., 2003; Kotze y Prichard, 2016; Herrera-Manzanilla et al., 2017). Como consecuencia, la efectividad de estos productos ha sido reducida debido a la selección antropogénica “accidental” de parásitos resistentes que han sido expuestos a un solo tipo de principio activo durante un determinado período de tiempo. Incluso, se han determinado especies parásitas de NGI que muestran multiresistencia; es decir, resistencia a dos o más activos antihelmínticos (Kotze y Prichard, 2016; Herrera-Manzanilla et al., 2017). Por otro lado, la mayoría de los compuestos antihelmínticos en el mercado poseen efecto residual y/o se excretan activos al ambiente, lo que representa un riesgo potencial en materia de salud pública; ya sea por la posibilidad de intoxicación por consumo de productos cárnicos y derivados contaminados o por generar resistencia en parásitos de importancia humana (Geerts y Gryseels, 2000; 2001). Además, los antihelmínticos también pueden generar eco-toxicidad en lugares donde se mantiene el ganado en pastoreo, debido a su eliminación en orina y excretas (Martínez y Cruz, 2009). Por lo tanto, la RA, al igual que la resistencia a los antibióticos y otros plaguicidas, plantean un paradigma sobre el uso de los productos empleados; y han despertado una necesidad creciente para diseñar estrategias integrales de control, que en el caso de los nematodos parásitos, se realiza atacando la fase de vida libre o la fase infectante mediante la combinación de medidas preventivas y correctivas (Waller, 1999; Ciancio y Mukerji, 2008; López et al., 2010; Terrill et al., 2012; Besier et al., 2016b).

Por tal motivo, es importante establecer medidas preventivas que disminuyan el riesgo de parasitosis en el ganado y administrar tratamientos de manera selectiva sólo a los individuos que lo requieran (López et al., 2010); esto es, siguiendo los lineamientos del control integrado de parásitos (Waller, 1999; Terril et al., 2012). Además, los programas de control integrado de parásitos se deben abastecer con compuestos selectivos para nematodos que cuenten con baja residualidad y toxicidad, con el propósito de minimizar los efectos nocivos que presentan los antihelmínticos comerciales en la actualidad; por otro lado, que tengan potencial para ser incluidos en sistemas de crianza orgánica (Kumar et al., 2013). El control biológico y los compuestos bioactivos contra parásitos parecen ser alternativas viables para el control de las parasitosis en rumiantes; y los hongos basidiomicetos representan uno de los grandes recursos de la naturaleza con potencial para encontrarlos (Li y Zhang, 2014; Valverde et al., 2015; Mattos-Shipley et al.; Degenkolb y Vilcinskas, 2016).

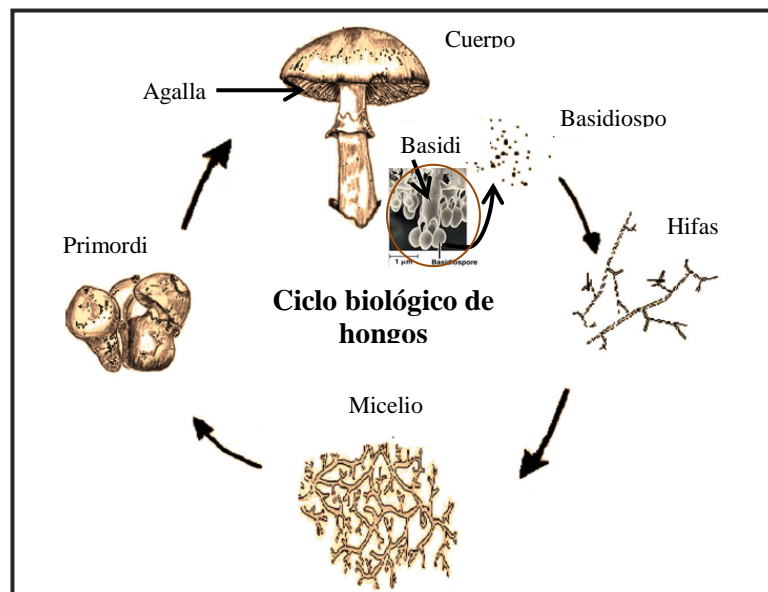
#### **2.4 Los hongos como fuente de nuevos antiparasitarios**

El reino de los hongos es uno de los grupos más diversos en la naturaleza. Se han estimado entre 1.5 y 5.1 millones de especies fúngicas en el mundo, incluyendo hongos mutualistas heterótrofos, patógenos y saprobios (Hawksworth, 1991; Blackwell, 2011). A la fecha, sólo entre 70,000 y 100,000 especies han sido reconocidas; dentro de las cuales cerca del 30% se han considerado comestibles y han tenido relevancia histórica por su uso en la cocina tradicional e inclusive algunas especies se han utilizado desde la antigüedad por sus efectos terapéuticos (Khan y Tania, 2012; Maftoun et al., 2015; Masri et al., 2017). En este sentido, el hongo *Agaricus bisporus* (champiñón, portobello, etc.) es el hongo comestible más reconocido en el mundo y, junto a *Pleurotus ostreatus* (setas), se consideran especies representativas de los hongos basidiomicetos (Mattos-Shipley et al., 2016).

##### **2.4.1 Hongos basidiomicetos**

Los hongos basidiomicetos, al igual que los ascomicetos son referenciados como “hongos superiores” y juntos forman un sub-reino taxonómico conocido como *Dykaria*. Los basidiomicetos son hongos multicelulares que se reproducen sexualmente por meiosis y producen esporas en estructuras llamadas basidios, de donde son dispersadas al ambiente.

En cada espora germinada, se presenta un crecimiento radial/apical de filamentos o hifas que en su conjunto conforman el micelio del hongo; posterior a la fusión citoplásmica entre hifas o plasmogamia (micelio dicariótico), se produce una estructura macroscópica conocida como basidiocarpo o cuerpo fructífero, el cual es resultado de hifas agrupadas (prosénquima) y/o desdiferenciadas (pseudoparénquima) (Huerta, 2001). Entre los pliegues de las agallas del hongo, se realiza la cariogamia que es la recombinación de dos núcleos ( $2n$ ), que a su vez forman los basidios (ver figura 3). En la clase de los *Agaricomycetes* se incluyen las especies más sobresalientes de los basidiomicetos y sus cuerpos fructíferos son tan variados que incluyen desde pequeños hongos de 2 mm de diámetro, hasta hongos que llegan a formar cuerpos fructíferos gigantes (400 -500 Kg de peso). Dentro de ésta clase se encuentra el organismo más extenso del planeta, una colonia individual de *Armillaria ostoyae* que se extiende 965 hectáreas dentro del parque Malheur de Oregon, Estados Unidos; y se estima que tiene entre 1900 y 8650 años de edad (Ferguson et al., 2003; Mattos-Shipley et al., 2016).



**Figura 4. Ciclo biológico de hongos basidiomicetos.** Se muestra, de manera muy laxa, el ciclo reproductivo de los hongos comestibles. Imagen adaptada de Deepalakshmi y Mirunalini, (2014b); Campbell y Reece (2009).

**Tabla 2. Clasificación taxonómica de los hongos *Pleurotus* sp.**

<b>Reino</b>	Fungi
<b>Subreino</b>	Dykaria
<b>Filo</b>	Basidiomycota
<b>Clase</b>	Agaricomycetes
<b>Orden</b>	Agaricales
<b>Familia</b>	Pleurotaceae
<b>Género</b>	<i>Pleurotus</i> (Fr.) P. Kumm.
<b>Especies</b>	<i>P. ostreatus</i> ; <i>P. eryngii</i> ; <i>P. cornucopiae</i> ; <i>P. djamor</i>

Fuentes: Hibbett et al. (2007); Deepalakshmi y Mirunalini (2014b); Mattos-Shiple y et al. (2016).

#### **2.4.2 *Pleurotus* sp.**

El género *Pleurotus* sp., comprende un conjunto de hongos multicelulares ampliamente diversificados y distribuidos mundialmente. En la actualidad, alrededor de 70 especies han sido descritas para éste género y algunas como *P. florida*, *P. sajor-caju*, y *P. ostreatus* generan mayor interés comercial (Royse y Sánchez, 2001; Maftoun et al., 2015; Masri et al., 2017). *Pleurotus* sp., oscila entre el segundo y tercer lugar en volumen de producción mundial, mientras *A. bisporus* ocupa el primer puesto (Royse y Sánchez, 2001; Rühl et al., 2008). El interés comercial de los hongos *Pleurotus* se basa en factores como: su adaptabilidad a diferentes ambientes, excelente calidad organoléptica, capacidad para adaptarse a diferentes sustratos (incluyendo desechos agroindustriales), temperaturas, a su facilidad de cultivo y bajo capital de inversión para su producción (Royse y Sánchez, 2001; Masri et al., 2017). Cabe mencionar que a pesar de que el hongo tiene la capacidad de crecer en una gran diversidad de sustratos lignocelulósicos, la morfología y rendimiento dependerá de condiciones ambientales, hábitat, clima, condiciones de cultivo, el tipo de sustrato utilizado e incluso condiciones de estrés biótico o abiótico (Kibar y Pekşen, 2008; Maftoun et al.; Hoa y Wang, 2015; Bellettini et al., 2016).

Los hongos *Pleurotus* son considerados comestibles, con un alto valor nutricional y medicinal (Cohen et al., 2002). Aunque también se han reportado proteínas citolíticas expresadas en el cuerpo fructífero del hongo *P. ostreatus*, como las toxinas ostreolisina y pleurotolisina, que parecen tener funciones hemolíticas y porogénicas (Berne et al., 2002; Frangež et al., 2017). A pesar de ello, *P. ostreatus* posee un alto margen de seguridad para consumo humano, ya que los efectos tóxicos por consumir los hongos crudos se manifiestan sólo si se han consumido en grandes cantidades. Por ejemplo: la DL<sub>50</sub> en ratas es mayor a 5 g de extracto de *P. ostreatus*/ Kg peso vivo (Deepalakshmi y Mirunalini, 2014a).

Son extensos los estudios que se han hecho acerca de las propiedades farmacológicas encontradas en estos hongos, entre las que se mencionan: efecto hipoglucémico, hipolipidémico, hipocolesterolémico, antineoplásico, antitumoral, antitrombótico, antiviral antiosteoporótico, antiinflamatorio, antioxidante, antimicrobiano, antifúngico e incluso, son una fuente potencial de sustancias activas en cosmetología (Masri et al.; Piska et al., 2017).

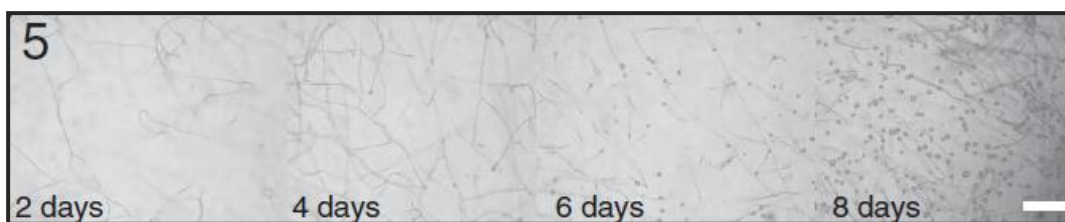
#### **2.4.2.1 Actividad nematófaga como rasgo común del género**

En el año de 1984 Thorn y Barron observaron que algunos hongos del género *Pleurotus* sp. (*P. cornucopiae*, *P. cystidiosus*, *P. ostreatus*, *P. strigosus* y *P. subareolatus*), eran capaces de inmovilizar y digerir nematodos de vida libre (*Panagrellus* spp.) así como colonias bacterianas, en condiciones deficientes de C y N. Estudios posteriores confirmaron el efecto, manteniendo los cultivos en condiciones de estrés nutritivo en agua-agar (Thorn y Barron, 1984; Thorn y Tsuneda, 1993). Desde entonces, se han estudiado diversas especies de *Pleurotus* sp., como: *P. eryngii*, *P. tuberregium* y *P. ostreatus* contra nematodos de vida libre *Rhabditis* sp., *Panagrellus* spp. (Barron y Thorn, 1987; Hibbett y Thorn, 1994) e incluso, *P. eryngii*, *P. ostreatus*, *P. cornucopiae* y *L. edodes*, se han estudiado contra el nematodo parásito *H. contortus* (Cómans-Pérez et al., 2014). Otro nematodo empleado en el estudio de actividad nematófaga de *P. eryngii* ha sido *Ancylostoma caninum*, el nematodo zoonótico de los perros (García et al., 2015).



De manera general, los hongos *Pleurotus* sp. comparten actividad nematófaga bajo un sistema de producción de toxinas inmovilizantes; y se sabe que algunas de éstas toxinas son reservadas en estructuras globulares del micelio aéreo, definidas como “toxocistos” (Clémenton, 2004). Los toxocistos han sido identificados por Thorn y Barron desde 1984, y han sido confirmados por una gran cantidad de autores. Estudiando dichas estructuras en *P. coremiopleurotus*, Truong y colaboradores (2007) hipotetizaron que los toxocistos podrían ser vestigios de estructuras de reproducción asexual, ya que algunos de ellos contenían material genómico.

Además, definieron que para obtener toxocistos es necesario que el hongo tenga un mínimo de nutrientes previo al estrés nutritivo; para ello, colocaron una pequeña cantidad de medio nutritivo agar papa y dextrosa (PDA por sus siglas en ingles) en una luneta sobre el centro de una placa de agar-agua y en un mínimo de ocho días, obtuvieron la formación de los toxocistos, los cuales están compuestos de un fluido hidrófilo contenido por una membrana elástica (ver figura 4). Este tipo de estructuras sirve al hongo para montar la estrategia de emergencia ante deficiencias nutrimentales. Kwok y colaboradores (1992) se interesó en el estudio de los toxocistos formados en *P. ostreatus*; para ello utilizó un sistema de paja de trigo humedecido como medio de cultivo, maceró con agua y fue separando compuestos de baja polaridad de forma gradual. Este trabajo le llevó al descubrimiento de un derivado graso, el ácido trans-2-decenodioico al que evaluó y comprobó su actividad inmovilizante en *P. redivivus*.



**Figura 5. Formación de toxocistos en *Pleurotus* subgen. *coremiopleurotus*.** Se observa la formación de estructuras globulares, responsables del atrapamiento de nematodos. Se obtienen sólo en condiciones de estrés nutritivo, en micelio aéreo y cultivos maduros. Imagen de: Truong y colaboradores (2007).

Hasta el año 2014 se han notificado 23 especies del género *Pleurotus* sp., con actividad nematófaga (Barron y Thorn, 1987; Li y Zhang, 2014) que parece ser un rasgo característico del género (Hibbett y Thorn, 1994). Además, nueve metabolitos activos de *Pleurotus* contra nematodos han sido descritos: cheimonophyllon E y 5-hydroxymethyl-furancarbaldehyde en *P. ferulae*; trans-2-decenedioic acid de *P. ostreatus*; p-anisaldehyde, p-anisyl alcohol, 1-(4-metoxifenil)-1,2-propano-diol y 2-hidroxi-(4'-metoxi)-propiofenona, ácido S-coriólico y ácido linoleico de *P. pulmonarius*.

De manera complementaria, existe evidencia de que las proteínas y derivados proteicos de los hongos comestibles, están implicadas con funciones dentro del sistema de defensa del hongo contra depredadores y parásitos (insectos, amebas, nematodos, etc.); lo que podría sugerir el estudio de sus propiedades biológicas contra nematodos parásitos (Sabotiê y Kos, 2012; Künzler, 2015).

## 2.5 Proteínas fúngicas contra nematodos

Las proteínas de hongos superiores parecen tener funciones esenciales en los procesos de defensa contra patógenos y antagonistas como bacterias, insectos, parásitos y amebas (Wang et al., 2002; Bleuler-Martínez et al., 2011; Sabotiç et al., 2016). De hecho, algunas toxinas identificadas tanto en hongos “venenosos” como comestibles, son compuestos de origen proteico, de los cuales se han identificado algunos como: ostreolisina, amatoxina, coprina, falotoxina y ácido acromélico A (Göransson et al., 2012; Jo et al., 2014).

Las proteínas de hongos, son el segundo componente molecular disponible después de los polisacáridos (Parihar et al., 2016); y el bajo índice graso, así como la ausencia de colesterol hace a los hongos excelentes fuentes de proteína (Xu et al., 2011). Los cuerpos fructíferos de hongos dicarióticos (ascomicetos y basidiomicetos) a menudo son ricos en proteínas entomotóxicas y nematotóxicas; entre las cuales se mencionan a lectinas e inhibidores de proteasas principalmente (Sabotiç et al., 2016). Estas proteínas se relacionan con funciones dentro del sistema de defensa innato del hongo contra depredadores y parásitos (Sabotiç y Kos, 2012; Künzler, 2015) y/o cumpliendo funciones en el desarrollo de los cuerpos fructíferos (Luan et al., 2010), entre otros. Lectinas fúngicas e inhibidores de proteasas han sido notificadas por su potencial aplicación en medicina (Dunaevsky et al.; Kobayashi y Kawagishi, 2014; Hassan et al., 2015).

Actualmente, las lectinas fúngicas se han implicado en la resistencia de hongos a parásitos; debido a su actividad letal contra nematodos (como *Caenorhabditis elegans* y *H. contortus*), insectos (como *Aedes aegypti*) y amebas (como *Acanthamoeba castellanii*) (Bleuler-Martínez et al., 2011; Stutz et al., 2015). Así como otras actividades entomotóxicas y nematotóxicas (Sabotiç et al., 2016). Por ejemplo, las lectinas fúngicas AAL de *Aleuria aurantia*, CCL2 y CGL2 de *Coprinopsis cinerea* han demostrado actividad biológica *in vitro* contra el nematodo parásito de ovinos, *H. contortus* (Heim et al., 2015); uno de los principales parásitos de interés pecuario (Vázquez et al., 2004; Waller y Chandrawathani, 2005; Rinaldi et al., 2015; Emery et al., 2016; Besier et al., 2016b).

La lectina POL del hongo *P. ostreatus* ha sido estudiada (Kogure, 1975) e identificada (Conrad y Rüdiger, 1994). Se ha descrito actividad supresora de ingesta de alimentos en ratones (Kawagishi et al., 2010), potente actividad antitumoral (Wang et al., 2000), y potencial como adyuvante (Gao et al., 2013). Sin embargo, no se ha descrito un efecto contra nematodos. Por el contrario, se han identificado metabolitos (toxinas) con actividad nematocida: como la ostreatina/ácido trans-2-decenodioico (Barron y Thorn, 1987; Kwok, et al., 1992), peróxido de ácido linoleico (Satou et al., 2008) y proteasas extracelulares (serin proteasas), demostrando potencial como posible hongo depredador de nematodos parásitos de importancia agropecuaria (Genier et al., 2015).

### **2.5.1 Proteínas de *Pleurotus ostreatus* con actividad biológica contra nematodos**

El interés que *P. ostreatus* ha originado en el campo de la medicina, se basa en la gran cantidad de compuestos biológicamente activos notificados (Sun y Liu, 2008; Vamanu 2012; Chowdhury et al., 2015), incluyendo proteínas como la lacasa antiviral (El-Fakharany et al., 2010), lectina POL antitumoral, inhibidora de ingesta alimentaria y adyuvante (Wang et al., 2000; Kawagishi et al., 2010; Gao et al., 2013). Además, *P. ostreatus* como hongo nematófago ha generado interés en el control biológico de plagas agrícolas. En este sentido, Okorie y colaboradores (2011) evaluaron su potencial contra el nematodo fitopatógeno *Meloidogine incognita* a nivel de invernadero; y a pesar de que se obtuvieron resultados alentadores con *P. ostreatus* en cultivos de soya (sobre todo en el cultivar TGX 1440-1E), aún no se han realizado mayores estudios en el área agrícola.

Por su parte, Jasso-Díaz y colaboradores (2014) estudiaron la actividad biológica de extractos miceliales de *P. ostreatus* ECS0152 y *P. eryngii* ECS1292 contra huevos del nematodo parásito de ovinos *H. contortus*. Entre los resultados del grupo se mencionan cinco bandas proteínicas en el extracto de *P. eryngii* con pesos moleculares entre 13 y 150 kDa. La actividad ovicida fue de 97.18 y 97.04% para las concentraciones de proteínas totales de 0.65 y 1.3 mg/mL respectivamente.

En el caso de *P. ostreatus* se obtuvieron tres bandas de entre 20 y 50 kDa. Se obtuvo una actividad ovicida de 62.34% y se consideraron las proteínas miceliales como posibles candidatos como agentes de control contra la hemoncosis ovina. Genier y colaboradores (2015) fueron los primeros en estudiar la actividad proteolítica de *P. ostreatus* contra nematodos de vida libre *P. redivivus*. En sus experimentos también determinaron la capacidad “predadora” del micelio en placas de agua-agar. Los resultados obtenidos fueron acordes con lo reportado por Thorn y Barron (1984). De hecho, mediante microfotografías fue posible observar los toxocistos característicos del micelio crecido en condiciones de estrés nutritivo. En lo referente a la actividad proteolítica, se obtuvo un perfil enzimático que demostró la presencia de más de una serin-proteasa. Cabe mencionar que la hipótesis de las serin proteasas en el sobrenadante, se confirmó a través de un zimograma que presentó halos de digestión en un gel de caseína-SDS-PAGE en condiciones óptimas de actividad proteolítica. El inhibidor de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF por sus siglas en inglés) inhibió la actividad proteolítica, confirmando su hipótesis planteada.

En el mismo año, Reyes y colaboradores realizaron la extracción de proteínas solubles a partir de micelio de *P. ostreatus* crecido sobre medio sólido harina de trigo integral (HIT), el extracto crudo obtenido fue enriquecido con inhibidor de proteasas PMSF a una concentración de 1 mM. La actividad biológica de inhibición de huevos, fue comparada con un extracto crudo micelial del hongo nematófago *Arthrobotrys oligospora* en similares condiciones, con la única diferencia del medio utilizado (PDA). El bioensayo realizado contra huevos del nematodo parásito *H. contortus*, confirmó la actividad biológica de los extractos de *P. ostreatus*, obteniendo 94.68 y 83.85% de inhibición a las 24 y 48 h, respectivamente. La cuantificación de proteínas totales del extracto fue de 371 µg/mL para el tratamiento con mayor concentración. En el caso del extracto crudo de *A. oligospora*, los datos del mayor tratamiento mostraron porcentajes cercanos al 20%; sin embargo, la concentración de proteínas totales cuantificadas fue un poco menor a la mitad que el tratamiento mayor de *P. ostreatus*.

Como parte de sus conclusiones, Reyes y colaboradores mencionaron que pese a que *A. oligospora* hubo presentado los menores porcentajes de inhibición en comparación con *P. ostreatus*, las larvas L1 eclosionadas parecían haber sido afectadas en su motilidad, posiblemente, debido al tratamiento al que fueron expuestas. Este hecho, abre la posibilidad para el estudio de proteínas derivadas de micelio de hongos *Pleurotus* contra nematodos parásitos.

### 3. Justificación

Los informes de RA son globales y se extienden a la mayoría de los AH disponibles en el mercado. La aparición de RA en un rebaño, genera dificultades para el tratamiento efectivo de la enfermedad; comprometiendo la salud, bienestar animal y rentabilidad del negocio. Además, a escala global, sitúa un panorama de peligro para el ecosistema y la salud pública. Por tal motivo, es importante establecer medidas preventivas que disminuyan el riesgo de parasitosis en el ganado, así como garantizar tratamientos AH efectivos que puedan aplicarse como terapia animal, incluso, dentro de sistemas de crianza orgánica. El control biológico y el uso de compuestos bioactivos contra parásitos, parecen ser alternativas viables. En este sentido, los hongos basidiomicetos representan uno de los grandes recursos de la naturaleza con cerca de 64 compuestos bioactivos contra nematodos; de los cuales, sólo uno ha sido evaluado contra un NGI de ratones. *H. contortus*, un NGI clave para el descubrimiento de los productos AH más actuales, ha mostrado susceptibilidad a extractos crudos de especies *Pleurotus*; sin embargo, no se han logrado identificar los compuestos bioactivos responsables y se desconoce si la actividad biológica se mantiene contra estadios larvales. El presente proyecto está encaminado hacia el descubrimiento del potencial biológico de proteínas de hongos comestibles (*Pleurotus* sp.) contra nematodos parásitos.

#### **4. Hipótesis**

El extracto crudo de *Pleurotus* sp. posee un efecto antagónico contra estadios larvales de *Haemonchus contortus*, y las proteínas participan en su actividad.



## 5. Objetivo general

Evaluar la actividad *in vitro* de extractos crudos de *Pleurotus* sp., y la participación de sus proteínas, contra huevos y larvas del nematodo parásito *H. contortus*.

### 5.1 Específicos

1. Determinar el potencial ovicida de cinco cepas de hongos comestibles del género *Pleurotus* (*P. cornucopiae* ECS-1329, *P. djamor* ECS-0123, *P. eryngii* ECS-1292, *P. ostreatus* ECS-1123 y *P. pulmonarius* ECS-0190) contra *H. contortus*.
2. Evaluar el potencial larvicida del extracto crudo seleccionado contra L3 y L4 de *H. contortus*.
3. Demostrar la participación de las proteínas fúngicas en la actividad biológica del extracto crudo.

## **6. Metodología**

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria del INIFAP (CENID-SAI/INIFAP). La metodología experimental fue dividida en cinco etapas: (1) producción y preparación de germoplasma, (2) extracción de proteína, (3) bioensayos, (4) inactivación de proteínas, y (5) pruebas de actividades proteicas seleccionadas.

### **6.1 Producción y preparación de germoplasma**

#### **6.1.1 Producción del micelio de *Pleurotus* sp.**

Las cepas de los hongos comestibles *P. cornucopiae* ECS-1329, *P. djamor* ECS-0123, *P. eryngii* ECS-1292, *P. ostreatus* ECS-1123 y *P. pulmonarius* ECS-0190, se recibieron en fase micelial provenientes del cepario micológico de “El Colegio de la Frontera Sur” (ECOSUR), unidad Tapachula. El material fúngico se sembró inmediatamente dentro de placas de Petri descartables (90 x 110 mm) y tubos de ensaye de vidrio (20 x 150 mm); ambos conteniendo medio agar papa y dextrosa (PDA) estéril 21 mL y 10 mL respectivamente. Se incubaron durante 7 d a 27°C en oscuridad y los tubos se mantuvieron en refrigeración a 4°C, con resiembras mensuales en medio PDA fresco. Los cultivos en placas de Petri fueron utilizados para mantenimiento de la cepa por el método de papel filtro en agua destilada y reservados a 4°C.

La preparación de pre-inóculos o cultivos semilla se realizó tomando un trozo de cultivo micelial en tubo y colocándolo en el centro de una placa con medio PDA (ver figura 6). El crecimiento del micelio se desarrolló 7 d en oscuridad a 27°C. De los mencionados cultivos semilla se cortaron fragmentos de 0.5 cm de diámetro, obtenidos de la periferia del crecimiento micelial y dichos fragmentos se colocaron en el centro de una placa con medio agar de trigo integral (HIT: 36 g de harina de trigo integral, 18 g sacarosa, 32 g agar bacteriológico). Éste medio fue seleccionado para la producción de micelio.



**Figura 6. Cultivo madre en PDA.** Se indican con una flecha los fragmentos recortados ( $0.5 \text{ cm}^2$ ) para la obtención de pre-inóculos en PDA.

### **6.1.2 Cosecha de micelio de *Pleurotus* sp.**

El micelio se recuperó mediante raspado en placa utilizando espátulas plásticas estériles. Se colectó dentro de tubos cónicos estériles de 50 mL de capacidad y se tomó el registro del peso húmedo en balanza analítica (esto se realizó para cada uno de los hongos). A manera de control negativo, se rasparon placas con medio HIT que contenían un fragmento de agar PDA sin micelio y sufrieron el mismo proceso de incubación. Los tubos con micelio se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 48 h.

### **6.1.3 Huevos de *Haemonchus contortus***

Se infectó de manera experimental un cordero (*Ovis aries*) de la raza Pelibuey de cuatro meses de edad, administrando 350 L3 de *H. contortus* sin vaina / Kg de peso vivo, vía oral; y mantenido bajo condiciones controladas de alojamiento y alimentación (*ad libitum*). Después de un período pre-patente de 21 días, las heces frescas fueron colectadas directamente del recto del cordero donador para confirmar la infección mediante el recuento de los huevos por gramo de heces (HPG) como lo describe Liébano y colaboradores (2011). Una muestra de heces se colectó de manera aséptica y, con referencia en el HPG obtenido, se utilizó para obtener huevos en fase de mórula.

Las heces se mezclaron con agua potable hasta tener una mezcla homogénea y fue filtrada sobre tamices granulométricos; los cuales se ensamblaron apilados formando una torre con aperturas descendentes: #100, #200 y #400, en estricto orden. El sedimento conteniendo huevos viables, se recuperaron en el tamiz #400, y se realizó un proceso de limpieza mediante gradientes con sacarosa acuosa al 40% centrifugando a 3500 rpm durante 5 minutos. El anillo se recuperó y se lavó en cuatro ocasiones utilizando un volumen de 10 mL de agua destilada estéril y centrifugando por 1 min entre cada enjuague (Liébano et al., 2011). Se eliminó el sedimento contaminante y los huevos (lo más limpios posible) se suspendieron en amortiguador salino de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés) 10mM pH 7.4. La concentración de huevos se determinó por la técnica de gota, utilizando diez alícuotas de 5  $\mu$ L cada una sobre un portaobjetos y cuantificando con apoyo de un microscopio óptico a través de un objetivo de 10X (Díaz, 2015). Una vez ajustada la concentración, inmediatamente se utilizaron los huevos para las pruebas biológicas.



**Figura 7. Proceso de obtención y limpieza de huevos.** La imagen superior izquierda muestra el tamizado de las heces frescas de un ovino infectado. Posteriormente, mediante un gradiente en sacarosa 40% se obtienen los anillos con huevos, que son enjuagados con agua destilada.

#### **6.1.4 Larvas infectantes de *H. contortus*.**

El cordero donador se introdujo a una jaula metabólica con la finalidad de colectar las heces en un lapso de 18-24 horas. Las heces se homogeneizaron con agua potable hasta una consistencia semilíquida y se mezcló en una proporción 1:3 con gragea de hule espuma para permitir aireación y retener humedad en el coprocultivo. La mezcla se realizó dentro de una palangana plástica, posteriormente se cubrió con una tapa ventilada y fue incubada durante siete días a temperatura ambiente, removiendo el material diariamente. Las larvas L3 fueron recuperadas por filtrar el coprocultivo a través de tela gasa sobre embudos de Baermann durante 12 horas. El sedimento de L3 recuperadas se colocó a 4°C durante dos horas; para posteriormente realizar un segundo filtrado a través de papel para limpieza de lentes ópticos 6 x 8" (Marca Carolina, USA), colocados sobre embudos de Baermann. El segundo sedimento de L3 se colocó una vez más a 4°C durante dos horas y se descartó el sobrenadante. Se cuantificaron las larvas por la técnica de la gota descrita anteriormente y se colocaron 100, 000 L3 dentro de una caja de cultivo celular de 250 mL con un volumen de agua de 45 mL. De ésta manera se mantuvieron las suspensiones larvarias a 4°C hasta su requerimiento referencia. Las L3 a utilizar fueron procesadas mediante gradientes con sacarosa 40% fría a 3500 rpm durante 5 minutos para su limpieza. El anillo de L3 se recuperó con pipeta Pasteur de 1 mL y se vertió en un tubo limpio. Se realizaron cuatro enjuagues con agua destilada estéril, centrifugando a las condiciones descritas en el apartado 7.1.2.



**Figura 8. Obtención de larvas L3 limpias.** Se muestra un anillo de L3 formado por gradiente en sacarosa 40%.

#### **6.1.5 Desenvaine de larvas infectantes**

La suspensión de L3 acuosa descrita en el apartado 7.1.3 se sedimentó por centrifugación a 3500 rpm durante 1 minuto y se eliminó sobrenadante. El precipitado de L3 se resuspendió a 10 mL con solución acuosa de hipoclorito de sodio 0.186%, v/v. La suspensión con hipoclorito de sodio se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente, inmediatamente después se realizaron cuatro lavados con agua destilada estéril. El sedimento de L3 desenvainadas se llevó a un volumen adecuado de PBS 10 mM pH 7.4 y se cuantificó por la técnica de gota para ajustar su concentración (se describe en el apartado 7.1.2) (Liébano, 2004).



**Figura 9. Vaina de una L3.** Vaina de una L3 expuesta a hipoclorito de sodio 0.186% durante 10 min.

#### **6.1.6 Cultivo para obtención de larvas histiotrópicas (L4)**

Para obtener larvas histiotrópicas de *H. contortus*, es necesario cultivar L3 desenvainadas y mantenerlas en condiciones específicas para su correcta evolución. Se utilizó una suspensión de 50,000 L3, las cuales fueron sedimentadas por centrifugación a 3500 rpm 1 min. Las L3 sedimentadas se resuspendieron en un volumen determinado de PBS 10 mM pH 7.4 enriquecido con anfotericina B y antibiótico-antimicótico (100  $\mu$ L c/u). Las L3 fueron incubadas en la solución de desinfección durante 2.5 h a 37°C y 50 rpm. Posteriormente, las larvas se sedimentaron y el sobrenadante fue descartado (Liébano, 2004). De manera alterna se preparó la solución de cultivo enriquecida con eritrocitos de borrego lavados con solución VyM (49.2 mL de solución HANKS con rojo fenol, sin bicarbonato de sodio; 0.246 mL de antibiótico-antimicótico; 0.492 mL de anfotericina B y  $8 \times 10^{-3}$  mL de eritrocitos lavados). Los cultivos se realizaron en frascos Roux de 250 mL de capacidad a 40 mL de volumen de trabajo. Los cultivos se incubaron durante 21 días a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> con recambio de medio cada tercer día. Las L4 fueron inspeccionadas en microcopio óptico con objetivo 10X, se determinó una L4 cuando la larva mostraba un desarrollo intestinal y se mantenían viables.

## **6.2 Extracción de proteína**

A partir de micelio cultivado en HIT durante 7 días a 27°C, se obtuvieron los extractos miceliales de cada una de las cuatro cepas de *Pleurotus*, siguiendo la metodología descrita por Reyes y colaboradores (2015).

### **6.2.1 Preparación y esterilización de extracto crudo**

6 g de micelio fueron homogeneizados en mortero y pistilo de porcelana estéril con 20 mL de PBS 10 mM pH 7.4 enriquecido con Tritón X-100 0.1% y PMSF 1mM. Cada uno de los cuatro extractos se depositaron en vasos de precipitados plásticos (estériles) y se mantuvieron en agitación constante a 4°C durante 24 horas, cubiertos con aluminio. Los extractos se sometieron a centrifugación (Sorvall ST8R, ThermoFisher Scientific: Alemania) a 4500 rpm durante 30 min a 4 °C y el sobrenadante fue esterilizado por presión positiva a través de filtros de jeringa estériles SFCA de 0.22 µm (CORNING: EUA). Todo el trabajo descrito con el extracto crudo fue realizado en frío.

### **6.2.2 Cuantificación de proteínas solubles**

La cuantificación de proteínas solubles se realizó por el método de Bradford (1976). El ensayo fue desarrollado sobre microplacas de 96 pozos de fondo plano (E.I.A./R.I.A., Costar: EUA). Se utilizó el colorante 5x para cuantificación de proteínas BIO-RAD (BIO-RAD, 70667A: EUA). El colorante Bradford concentrado se mantuvo en refrigeración a 4 °C hasta su uso. Previo a disponer del mismo, se temperizó por dos horas, posteriormente se diluyó tomando 4 mL del colorante BRADFORD concentrado y mezclándolo con 16 mL de agua Milli-Q. Ésta mezcla se filtró a través de papel Whatman #1, y se utilizó recién preparada para la cuantificación de proteínas.

Una solución estándar con Albumina Bovina de Suero (BSA), fue preparada pesando 10 mg de BSA (Sigma, A-4503: EUA) y aforando a 10 mL con PBS 10 mM pH 7.4, para una concentración de trabajo de 1 mg/mL. La solución de BSA fue utilizada para obtener la curva patrón de concentración proteica, agregando en cada caso: 0, 10, 20, 40, 80, 160 µL de BSA 1 mg/mL en 200, 190, 180, 160, 120 y 40 µL de PBS 10 mM pH 7.4, respectivamente para obtener un volumen final de 200 µL.



Las concentraciones de BSA obtenidas de ésta forma, fueron: 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mg/mL, en total seis concentraciones. 10  $\mu$ L de cada una de éstas seis concentraciones se depositaron en cada pozo de una microplaca nueva. Cada concentración de la curva patrón se realizó por triplicado. Por otro lado, las muestras de extracto crudo fueron diluidas de manera seriada hasta  $10^{-3}$ , y fueron depositados 10  $\mu$ L de cada una de las muestras, también por triplicado. Posteriormente, se añadieron 200  $\mu$ L de colorante de Bradford 1X a cada uno de los pozos elegidos para la curva patrón y la determinación de la muestra de extracto crudo, resuspendiendo con puntas de micropipeta nuevas para cada pozo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 min previo a la lectura. La lectura se realizó en un lector de microplacas (iMark, BIO-RAD: Japón) con un filtro a 595 nm. Los valores fueron registrados y utilizados para crear una gráfica de dispersión, en la cual se obtuvo la ecuación de regresión lineal y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ). Se despejó el valor de la concentración desconocida de la muestra de extracto crudo y sus diluciones que tuvieron absorbancias dentro de los límites de confianza de la curva patrón ( $r^2 > 0.97$ ). De ésta forma, se determinó la concentración de proteínas totales, obteniendo el valor de concentración y multiplicando por el inverso de la dilución que se haya elegido.

### **6.2.3 SDS-PAGE 5-12%**

Para el análisis cualitativo del perfil proteico se utilizó un sistema de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE) con una fase concentradora y una fase separadora 5-12%, respectivamente. Una solución acuosa de persulfato de amonio (PSA) 10%, fue preparada pesando 0.1 g de PSA (BIO-RAD, 161-0700: EUA) y llevando a 1 mL con agua milliQ. El gel separador se formuló como se muestra en la tabla. La mezcla se vertió dentro de un juego de vidrios con separación de 0.75 mm hasta 3 cm del borde superior. Inmediatamente se agregó 1 mL de isopropanol y se permitió polimerizar a temperatura ambiente. Posterior a dos enjuagues con agua milliQ, se preparó el gel de la fase de concentración como se muestra en la tabla. Se vertió la mezcla dentro de los vidrios hasta el borde y se colocó un peine de 15 pozos. Se permitió polimerizar a temperatura ambiente.

<b>Tabla 3. Preparación de geles de poliacrilamida en gradiente</b>		
Reactivos	Gel separador ( $V_f = 10$ mL)	Gel concentrador ( $V_f = 3$ mL)
H <sub>2</sub> O milliQ	3.3	2.1
mix de acrilamida-bis acrilamida 30%	4	0.5
Tris 1.5 M pH 8.8	2.5	-
Tris 1 M pH 6.8	-	0.38
SDS 10%	0.1	0.03
PSA 10%	0.1	0.03
TEMED	0.004	0.003

Las muestras se colocaron previa desnaturalización con buffer de Laemli y baño maría a 80°C por 10 min. Se cargaron 16  $\mu$ L de las muestras desnaturalizadas y controles en los pozos; así como 4  $\mu$ L de marcador molecular de amplio espectro, por corrida. Se utilizó una solución tampón Tris/glicina (Tris/glicina/SDS 10X BIO-RAD, 161-0772: EUA) diluida a 1X con agua milliQ. Las condiciones de corrida fueron a 45V, 13 mA durante 40 min y se separó a 90V, 11-20 mA por 3 h. Durante la corrida electroforética, la cámara de corrida se mantuvo en baño de hielo para evitar sobrecalentamiento.

### **6.2.3.1 Tinción con azul de Coomassie**

Los geles electroforéticos fueron obtenidos y enjuagados por hasta cuatro ocasiones en un volumen suficiente de agua destilada. Se utilizó un agitador y se mantuvieron en agitación oscilante a 20 rpm durante 5 min por cada enjuague. Posteriormente, se añadieron 40 mL de solución de tinción Coomassie (Solución azul brillante Coomassie R-250, BIO-RAD: EUA) y se incubó a temperatura ambiente durante 50 min en agitación oscilante a 15 rpm. Se realizaron tres enjuagues con agua destilada, en las condiciones mencionadas anteriormente, con el fin de eliminar residuos del colorante. Se realizó la eliminación del colorante unido al gel de manera no específica con una solución desteñidora I durante 20 min a 30 rpm. Posteriormente, el gel se cambió a una solución de destinción II y se incubó durante toda la noche a 15 rpm. Se capturaron imágenes en fotodocumentador.

### 6.3 Bioensayos

Los extractos crudos de micelio de las cuatro especies *Pleurotus* fueron evaluadas *in vitro* utilizando huevos, L3 y L4 de *H. contortus*, como indicadores biológicos del potencial nematocida. La asignación de los tratamientos fue aleatorizada, bajo un modelo completamente al azar; donde las variables de respuesta consideradas fueron los porcentajes de inhibición de la eclosión de huevos (%IEH) o inmovilidad larvaria (%PL). La concentración máxima utilizada se limitó a la concentración proteica alcanzada en los extractos íntegros de cada uno de los extractos crudos, y sus diluciones en serie fueron utilizadas para la determinación de los límites de actividad letal de cada extracto. Posteriormente, se realizó un análisis Probit para determinar la concentración de inhibición promedio (CI<sub>50</sub>) de cada uno de los extractos evaluados. Los extractos se consideraron letales cuando los porcentajes de actividad, fueron superiores al 85%.

#### 6.3.1 Diseño experimental

Los tratamientos fueron asignados de manera aleatoria, utilizando un sistema manual por tómbolas, en las cuales se introdujeron papeles marcados con cada uno de los tratamientos y las coordenadas de cada uno de los pozos de la placa de trabajo. Esto se realizó hasta concluir con el número de tratamientos asignados a cada experimento.

El estudio de actividad se basó en un modelo completamente al azar ( $Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$ ), donde los tratamientos de los cuatro extractos crudos de *P. cornucopiae* ECS, *P. djamor* ECS0123, *P. eryngii* 1292 y *P. ostreatus* ECS1123 (EPc, EPd, EPe y EPo, respectivamente); así como sus controles, se colocaron aleatoriamente en pozos de microplacas de 96 pozos con fondo de U, estériles (Nunc<sup>®</sup> MicroWell<sup>™</sup>, ThermoScientific: Dinamarca). Las unidades experimentales consistieron de 100 huevos o larvas de *H. contortus* en un volumen final de 100 µl con tratamiento. La incubación se realizó a 28 °C durante 24, 48 y 72 h para larvas y 48 a 72 h para huevo. La lectura y cuantificación de los datos crudos se realizó por la inspección bajo un microscopio óptico con un objetivo 10X.

### **6.3.2 Inhibición de la eclosión**

Los extractos se disolvieron en PBS 10 mM pH 7.4 al doble de la concentración requerida, y se dispusieron en 80  $\mu$ L en cada unidad experimental designada previamente. De manera alterna, a partir de un volumen suficiente de suspensión de huevos de *H. contortus* en PBS 10 mM pH 7.4 estéril (5000 huevos/mL), enriquecida con anfotericina B (5  $\mu$ g/mL de suspensión) y continuamente homogeneizada, se colocaron 20  $\mu$ L en cada unidad experimental. El bioensayo se realizó sobre microplacas de titulación de 96 pozos, estéril y de fondo redondo (Nunc<sup>®</sup> MicroWell<sup>™</sup> 96 well, P5366: SIGMA-ALDRICH). De ésta manera, los tratamientos aplicados (seis repeticiones) fueron diluidos 4:1 con la suspensión de huevos y la concentración obtenida fue la reportada. La placa se selló con una tapa adhesiva no estéril (SealPlate<sup>®</sup> film, Z369659: SIGMA-ALDRICH) y fue incubada a 28 °C durante 48 y 72 h, hasta su lectura mediante microscopio de campo de luz a 10X. Se obtuvo el porcentaje de inhibición de la eclosión para cada tratamiento, determinado por el cociente de la cantidad de huevos y la cantidad de L1 cuantificadas en cada tratamiento.

### **6.3.3 Actividad letal contra larvas**

Se realizó una corrida independiente para cada uno de los tratamientos a evaluar, así como para cada tiempo de lectura, montados sobre microplacas de titulación de 96 pozos estériles con fondo redondo (Nunc<sup>®</sup> MicroWell<sup>™</sup> 96 well, P5366: SIGMA-ALDRICH). Se partió de un volumen suficiente de una suspensión de larvas en PBS 10 mM pH 7.4 estéril a concentración de 5000 L3 sin vaina/mL. La suspensión fue enriquecida con 5  $\mu$ g de anfotericina B por mililitro de volumen. Se colocaron los tratamientos al doble de la concentración requerida, disueltos en PBS 10 mM pH 7.4, previa asignación, en cada una de las unidades experimentales. En seguida, 100 larvas fueron colocadas en cada uno de los pozos en un volumen de 20  $\mu$ l. Con ello, se obtuvo un volumen final de 100  $\mu$ l por pozo. Cada uno de los tratamientos contó con cinco repeticiones.

Las placas se sellaron con tapas adhesivas no estériles (SealPlate<sup>®</sup> film, Z369659: SIGMA-ALDRICH) y se incubaron a 28 °C durante 24, 48 y 72 horas. Para su lectura y cuantificación se utilizó un microscopio de campo de luz a 10X. Los porcentajes de inmovilidad se obtuvieron por el cociente entre larvas móviles y larvas inmóviles en cada uno de los tratamientos

#### 6.3.4 Análisis de datos experimentales

Los datos crudos fueron corregidos en cada una de las corridas experimentales, mediante la fórmula de Schneider-Orelli (Püntener, 1981):  $[\%_{\text{correg}} = \{(\bar{X}_{\text{trat}} - \bar{X}_{\text{cont}}) \div (100 - \bar{X}_{\text{cont}})\} * 100]$  A partir de los promedios crudos, se obtuvieron las proporciones  $[\tilde{P} = \% \div 100]$  que fueron transformadas a su Arco seno-raíz  $[Y = \text{arcoseno}(\sqrt{\tilde{P}})]$ , con el propósito de cumplir con los supuestos de normalidad (Shapiro-Wilk,  $\alpha = 0.05$ ) y homogeneidad de varianzas (Levene,  $\alpha = 0.05$ ) (Giesbrecht y Gumpertz, 2004). Los datos transformados fueron utilizados para un análisis de varianzas (ANAVA,  $\alpha = 0.05$ ) en paquete estadístico STATISTICA 7 (©StatSoft Inc., 1984-2004). Los tratamientos con significancia estadística se compararon por su diferencia honesta significativa (prueba de Tukey,  $\alpha = 0.05$ ) y se declaró una mayor o menor actividad letal, cuando los valores resultaron significantes estadísticamente ( $P < 0.05$ ).

#### 6.4 Inactivación de proteínas

Los extractos crudos de micelio de las cuatro cepas de *Pleurotus*, fueron contrastados a través de pruebas biológicas contra extractos sometidos a inactivación de proteínas. En el presente trabajo se evaluaron tres tipos de inactivación: 1. Por calor, 2. Por uso de enzimas (tripsina) y 3. Por el uso de inhibidores (PMSF).

#### **6.4.1 Inactivación por calor**

Los extractos proteicos miceliales se sometieron a un proceso de inactivación por calor mediante un baño maría a 100 °C durante 60 minutos. Posteriormente, los extractos inactivados se resuspendieron por agitación y fueron utilizados para su evaluación mediante bioensayos *in vitro*.

#### **6.4.2 Inactivación por el uso de enzimas (tripsina)**

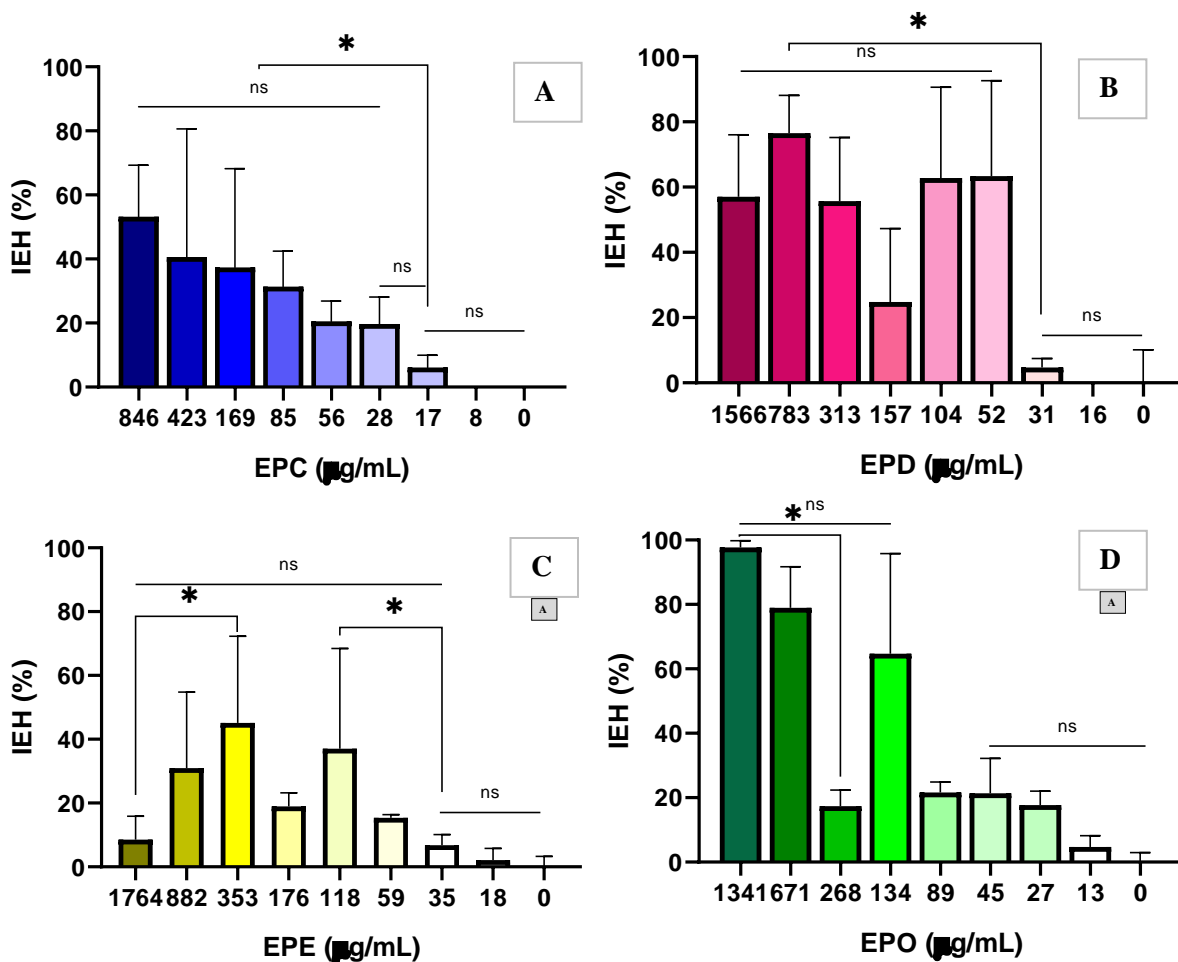
Los extractos crudos de micelio fueron digeridos con 0.1 mg/mL de tripsina. Posterior al tiempo de incubación, los extractos inactivados fueron evaluados mediante bioensayos y la CL<sub>50</sub> fue determinada por Probit.

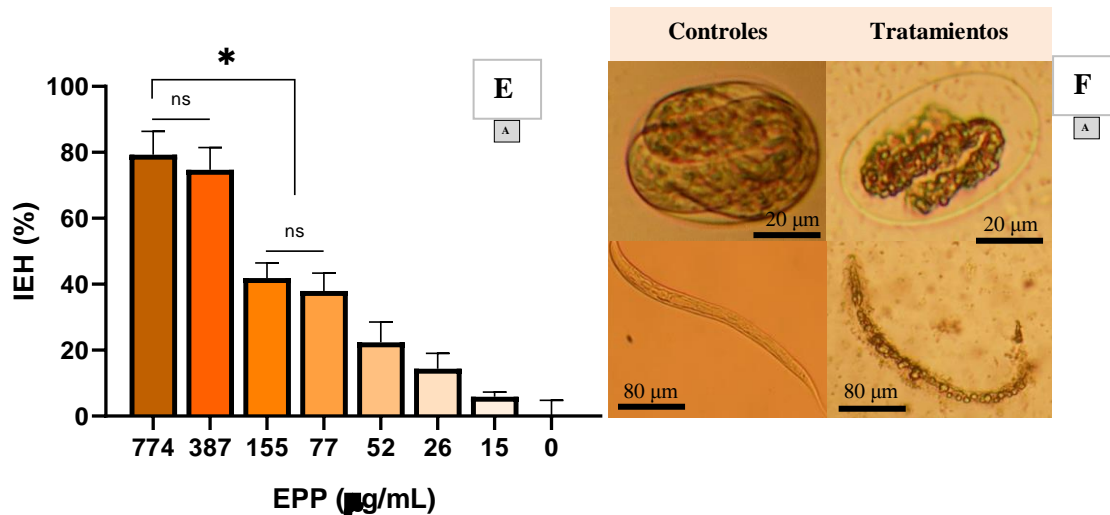
#### **6.4.3 Inactivación por el uso de inhibidores (PMSF)**

Los extractos crudos de micelio se enriquecieron con 1 mM de fenil metil sulfonilo (PMSF, por sus siglas en inglés) y la actividad letal residual fue evaluada de la misma forma que los extractos mencionados anteriormente.

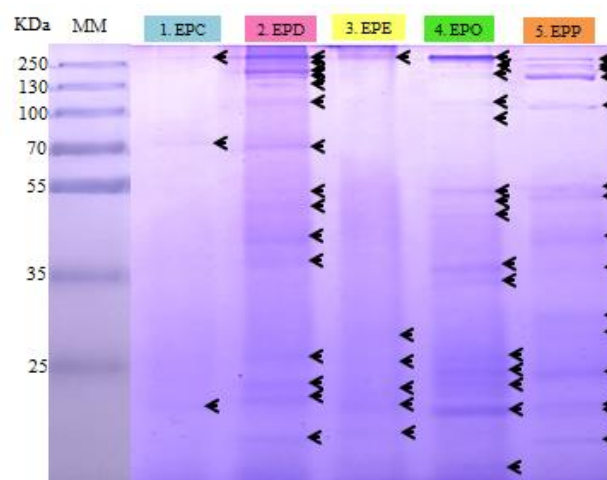
## 7. Resultados

Todos los extractos crudos evaluados, tuvieron actividad inhibitoria contra huevos de *H. contortus* (figura 10). Los extractos con mayor actividad fueron obtenidos de *P. ostreatus*, y *P. pulmonarius* con 97.6 y 79.2 % de IEH, respectivamente. El extracto de menor actividad se preparó con micelio de *P. eryngii* (45.1%), seguido de *P. cornucopiae* (53.1%) y *P. djamor* (76.5%). De acuerdo a la prueba de Shapiro-Wilk, los datos transformados fueron no normales ( $P < 0.05$ ); excepto para los datos del extracto de *P. pulmonarius* ( $P > 0.05$ ). Debido a ello, los datos obtenidos por los extractos de *P. cornucopiae*, *P. djamor*, *P. eryngii* y *P. ostreatus* fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis (no paramétrica), sólo en el caso del extracto de *P. pulmonarius* se utilizó un ANOVA de una vía, complementado con un análisis PROBIT, el cual determinó una concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) de 120  $\mu\text{g/mL}$ . El experimento realizado para evaluar la inhibición en la eclosión de huevos de *H. contortus* por los distintos extractos, permitió observar huevos inhibidos con larva embrionaria en su interior, encontrando también, sobre todo en el extracto crudo de *P. pulmonarius*, larvas L1 con una morfología atípica (figura 10f).





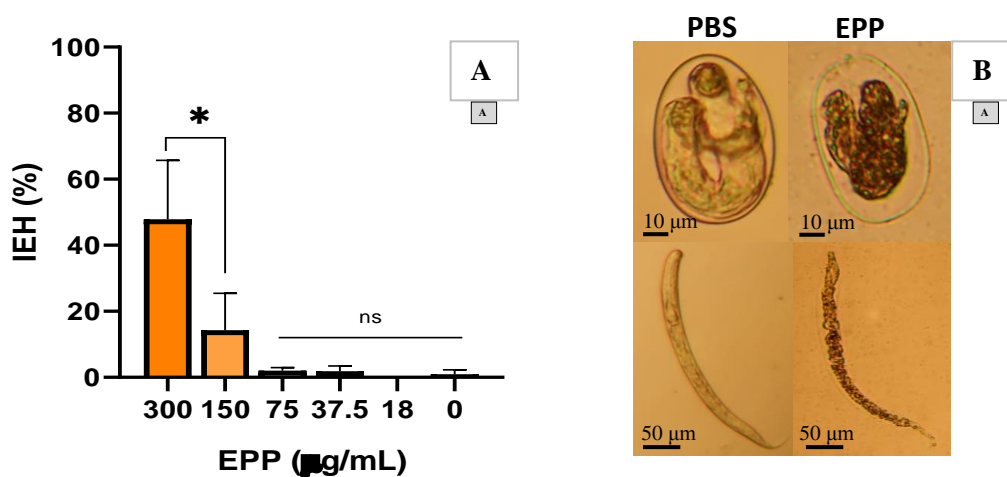
**Figura 10. Estudio de la actividad inhibitoria de extracto crudo de hongos *Pleurotus* spp.** Se muestran porcentajes de IEH obtenidos por extractos de: A) *P. cornucopiae* (EPC), B) *P. djamora* (EPD), C) *P. eryngii* (EPE), D) *P. ostreatus* (EPO) y E) *P. pulmonarius* (EPP) a las 72h de exposici3n. Los datos A-D se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis ( $\alpha=0.05$ ), E se analiz3 mediante ANOVA de una v3a ( $\alpha=0.05$ ). Los asteriscos muestran diferencias entre los tratamientos ( $P<0.05$ ), ns= con diferencias no significantes ( $P>0.05$ ). La figura F muestra un huevo larvado viable (capturado a las 14h de iniciado el experimento) y una L1 viva encontradas en el control con PBS 10 mM (columna izquierda), en distintos tratamientos se observaron huevos larvados no viables y L1 muertas como lo muestra la imagen en la columna derecha.



**Figura 11. Perfil prote3nico de los extractos crudos de *Pleurotus* sp.** Se presenta un gel de poliacrilamida bif3sico 5-12%, corrido en condiciones desnaturalizantes con SDS y te3ido con Coomassie brillante R-250. En cada carril corri3 un extracto crudo, revelando entre sus componentes la presencia de prote3nas. Las bandas se marcaron con peque3as flechas, 3 para EPC, 15 para EPD, 6 para EPE, 15 para EPO y 15 para EPP.



El experimento para la evaluación de la actividad inhibitoria con EPC, EPD, EPE, EPO y EPP contra huevos de *H. contortus*, se realizó una segunda ocasión con cada uno de los extractos que se mantuvieron durante 30 d en refrigeración a 4°C. Los datos obtenidos indicaron una pérdida de la actividad de IEH en general, excepto para EPO (98.7% en extracto íntegro y 52.2% en dilución 1/2), EPP (74.9% en extracto íntegro) y EPC (23.2% en extracto íntegro) (datos no presentados). En el experimento mencionado, se logró identificar un posible efecto larvicida para el tratamiento con EPP. Debido a ello, se realizó un tercer experimento en el cual se utilizó una alícuota de EPP congelada durante 3 meses, y se evaluó contra huevos de *H. contortus*. Los resultados reflejaron una actividad máxima de  $47.8 \pm 17.9\%$  de IEH a una concentración de 300  $\mu\text{g/mL}$  (figura 12).



**Figura 12. Estudio de la actividad inhibitoria del EPP mantenido en congelación.** La figura A muestra una actividad máxima de  $47.8 \pm 17.9\%$  de IEH ( $P < 0.05$ ). En las imágenes de B se presentan dos columnas, mostrando las diferencias morfológicas entre los especímenes del control y los tratados con EPP. Los huevos cuantificados a pesar de estar larvados, presentaban una morfología atípica, de la misma manera se descubrió que la actividad contra las L1 se mantuvo a partir de 75  $\mu\text{g/mL}$ .

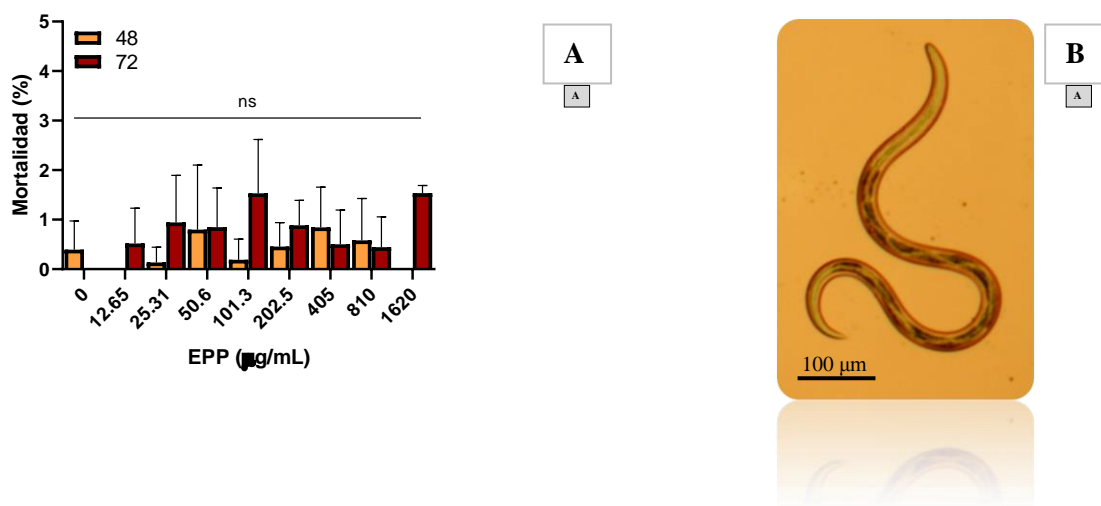
Con base en los resultados anteriores, se seleccionó la cepa *P. pulmonarius* para una nueva extracción y evaluación contra huevos del nematodo parásito. El experimento planteado, exhibió una actividad cercana al 100% para todos los tratamientos evaluados; siendo de 260  $\mu\text{g/mL}$  la concentración más baja evaluada del extracto (tabla 4). De manera

complementaria, el efecto contra L1 fue nuevamente observado. Por lo tanto, se decidió evaluar el extracto crudo de *P. pulmonarius* contra estadios larvales del parásito, utilizando larvas infectantes L3 y larvas histiotrópicas L4, como indicadores de dicha actividad.

Tabla 4. Inhibición de la eclosión de huevos del nematodo <i>Haemonchus contortus</i> por el extracto crudo del hongo <i>P. pulmonarius</i> cepa ECS-0190.			
Tratamientos	Concentración (mg/mL)	% de inhibición	Tukey (P< 0.05)*
Extracto proteico	1.35	100	a
	0.68	100	a
	0.37	100	a
	0.28	99.8 ± 0.8	a
	0.26	99.9 ± 0.2	a
Control PBS	0	4.6 ± 5.0	b

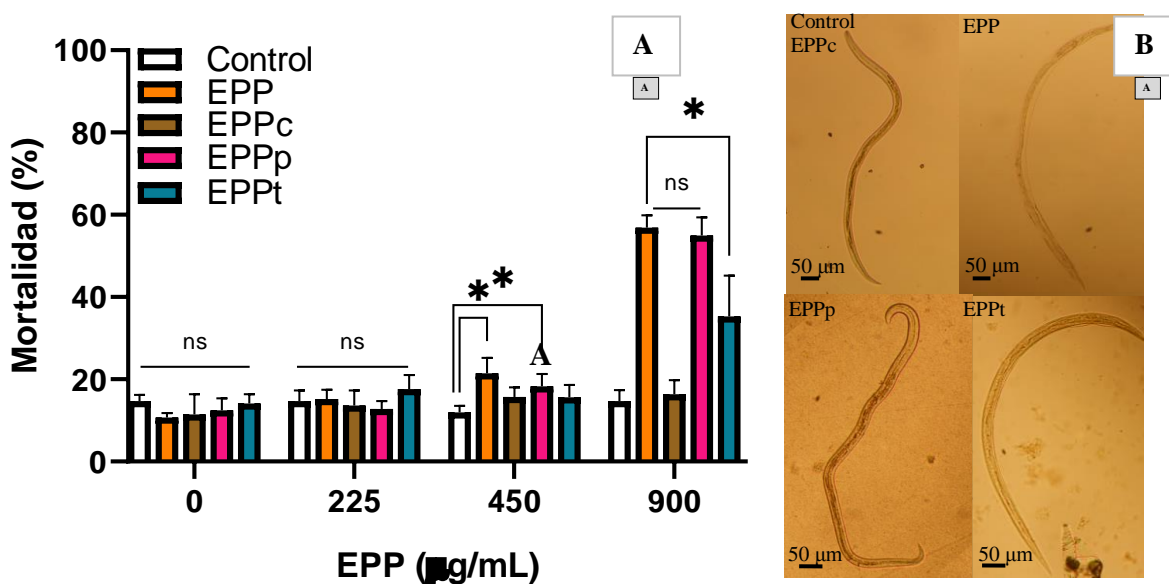
\*La misma letra en la columna representa promedios iguales (P< 0.05)

Las larvas infectantes se desenvainaron y se expusieron durante 48 y 72 h al extracto crudo de *P. pulmonarius*; sin embargo, los distintos tratamientos no tuvieron efecto visible en las larvas, observándose vivas y con motilidad completa. Los porcentajes de mortalidad fueron estadísticamente no significantes (P>0.05) (figura 14).



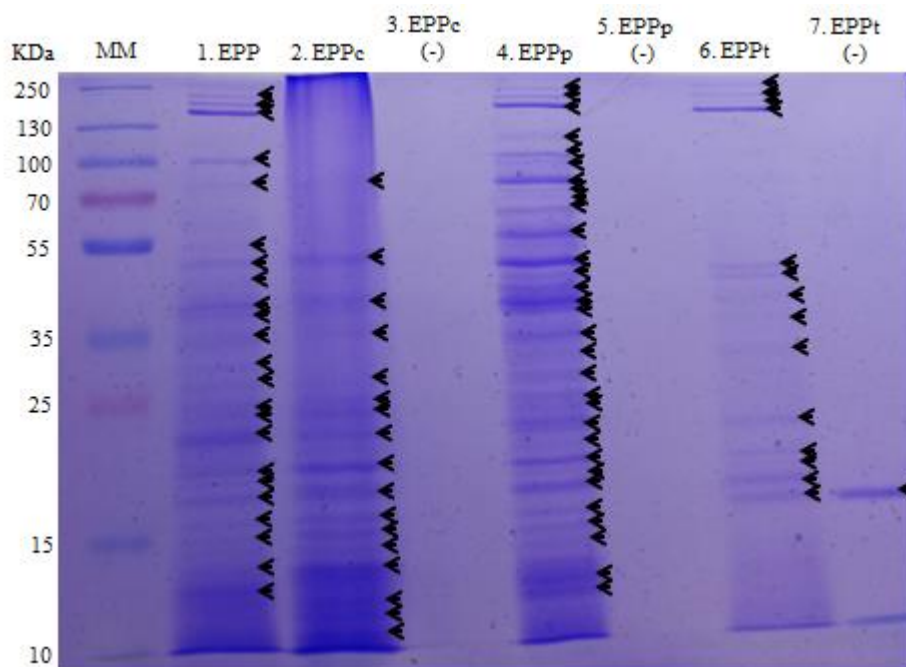
**Figura 13. Actividad del extracto crudo de *P. pulmonarius* contra larvas infectantes.** La figura A presenta los porcentajes de mortalidad obtenidos (P>0.05). En la figura B se muestra una larva L3 desenvainada sin daño aparente. Este tipo de larvas fueron encontradas durante la cuantificación de las unidades experimentales.

Para la evaluación del EPP contra larvas histiotrópicas (L4), los datos señalaron una actividad biológica del 56.9% de mortalidad a las 72h, confirmando el efecto mediante nula respuesta de las larvas a estímulos físicos. El extracto crudo activo contra L4, fue entonces comparado contra alícuotas inactivadas por PMSF, calor y tripsinización. Los datos obtenidos indicaron diferencias en la actividad entre tratamientos ( $P < 0.05$ ). El extracto crudo tuvo una actividad del  $56.9 \pm 3\%$  de inmovilidad, comparable sólo con el extracto inactivado por PMSF con  $54.9 \pm 4.4\%$  ( $P > 0.05$ ) y significativo contra todos los demás tratamientos ( $P < 0.05$ ). El extracto digerido por tripsina disminuyó su actividad hasta  $35.3 \pm 9.9\%$ . El extracto inactivado por calor ( $16.3 \pm 3.3\%$ ), no tuvo diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) con respecto al control de PBS  $14.7 \pm 2.6\%$  (figura 14).



**Figura 14. Actividad antagónica de EPP y EPP inactivado por calor, por inhibidor y por tripsinización contra L4 de *H. contortus*.** A) Se presentan los porcentajes ajustados de la actividad letal de los tratamientos con extracto crudo en comparación con extractos inactivados. A 900 µg/mL se observa que los porcentajes de mortalidad de EPP y EPPp no tuvieron diferencias estadísticas significativas entre ellos ( $P > 0.05$ ), pero sí contra los demás tratamientos ( $P < 0.05$ ). B) El efecto observado en las L4 de cada uno de los tratamientos.

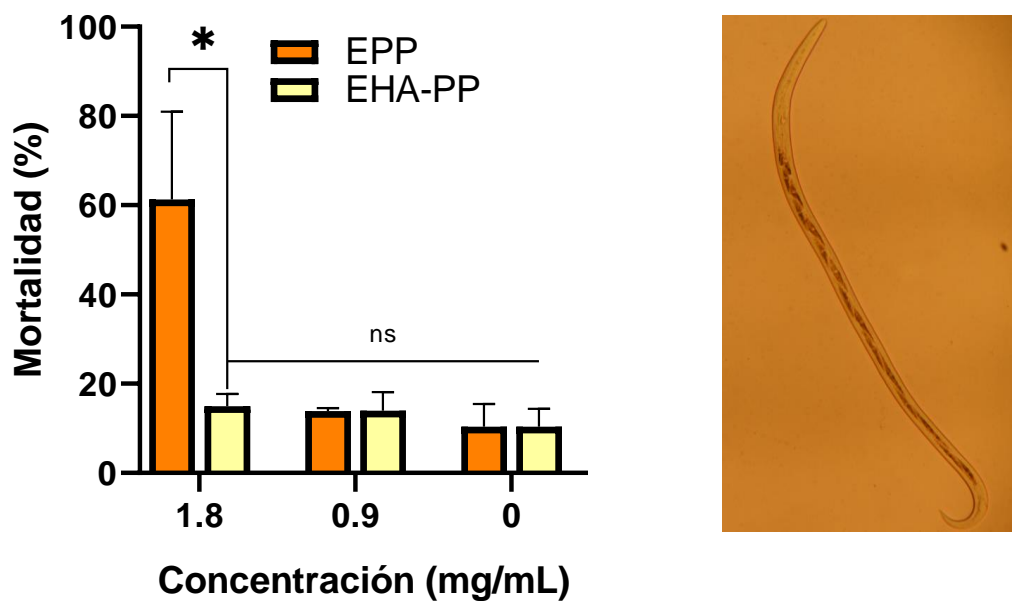
El perfil proteico de los tratamientos ensayados, también mostró leves diferencias entre los perfiles proteicos del extracto crudo y el extracto inactivado con PMSF. Para EPP se determinaron 23 bandas de proteínas, 17 para EPPc, 32 para EPPp y 14 para EPPt. Cada uno de los tratamientos se corrió con el control correspondiente, siendo el mismo para EPP y EPPc. Algunas bandas de proteínas se manifestaron en los tratamientos que fueron activos contra las larvas, observando nula presencia en el tratamiento inactivado por calor (figura 15).



**Figura 15. Perfil proteínico de los tratamientos de EPP crudo e inactivados.** Las bandas de proteínas obtenidas por tinción con azul de Coomassie brillante R-250, fueron señaladas con flechas. Se contaron 23 para EPP, 17 para EPPc, 32 para EPPp, 14 para EPPt. Los controles negativos no mostraron bandas de proteínas excepto el control con tripsina (carril 7).

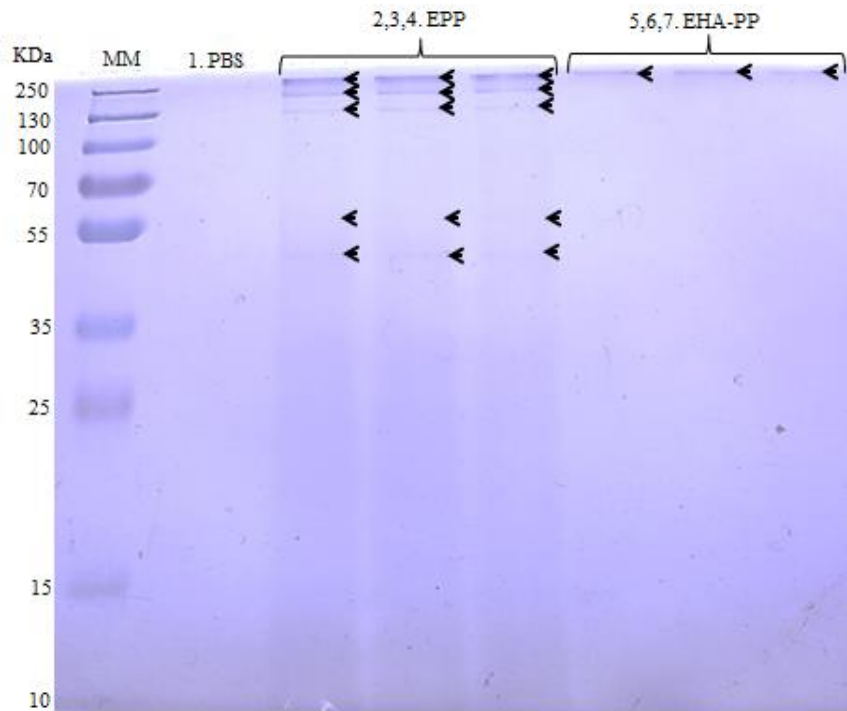
Con el objetivo de confirmar la participación de proteínas en la actividad biológica del EPP contra L4, se contrastó el efecto biológico del mismo contra un extracto hidroalcohólico del micelio de *P. pulmonarius* (EHA-PP) obtenido en las mismas condiciones de cultivo. Los resultados mostraron una clara diferencia entre ambos tratamientos ( $P < 0.05$ ) de  $14.9 \pm 2.6$  del EHA a  $61.2 \pm 19.6\%$  a concentración de 1.8 mg/mL (figura 16). A las 24 h fue posible

observar L4 presentando movimientos erráticos e involuntarios en algunas observadas en el EPP. Además de este tipo de movimiento, no había desplazamiento en el campo de lectura, a diferencia de las L4 observadas en el tratamiento EHA-PP y el control.



**Figura 16. Comparación de actividad biológica entre el extracto crudo y el extracto hidroalcohólico de *P. pulmonarius*.** A) se observan los porcentajes ajustados de actividad letal contra larvas histiotrópicas (L4) a 48h de exposición (\* = diferencia significativa,  $P < 0.05$ ). La figura B describe la morfología de las larvas cuantificadas en el tratamiento EPP a las 48h.

Para observar el perfil proteínico entre el EHA-PP y el EPP, se corrió un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Se reveló la presencia de sólo cinco bandas de proteínas en el tratamiento del EPP, con pesos arriba de 35 kDa. En el caso del EHA-PP se observó una banda de proteínas de arriba de 250 KDa (figura 17).



**Figura 17. Perfil proteínico del EPP y EHA-PP.** Se presenta el gel en el que se comprueba que el EHA-PP no contiene un gran número de proteínas, encontrando sólo una banda de alto peso molecular.

## 8. Discusión

Los extractos crudos de *P. eryngii* cepa ECS-1292, *P. ostreatus* cepa ECS-0152 y *P. ostreatus* cepa ECS-1123 han sido evaluados previamente contra huevos del nematodo parásito *H. contortus* (Jasso-Díaz et al., 2014; Reyes et al., 2015). Jasso y colaboradores (2014) estudiaron el efecto del extracto crudo de *P. eryngii* ECS-1292 y de *P. ostreatus* ECS-0152 obteniendo un máximo de actividad de 97% y 62.3% de IEH, respectivamente. Por su parte, Reyes y colaboradores (2015) notificaron una actividad del 94.7% de IEH para el extracto de *P. ostreatus* ECS-1123. En el presente trabajo, se amplía el conocimiento sobre extractos crudos de especies *Pleurotus* no descritas hasta el momento, como *P. cornucopiae* cepa ECS-1329, *P. djamor* cepa ECS-0123 y *P. pulmonarius* cepa ECS-0190. Los extractos crudos de *P. eryngii* ECS-1292 y *P. ostreatus* ECS-1123 fueron tomados en cuenta para confirmar el efecto inhibitorio reportado previamente. Sin embargo, los resultados de 45.1% de IEH contrastaron con los reportados por el grupo de Jasso para *P. eryngii* ECS-1292 (97%), denotando posibles diferencias metodológicas entre ambos experimentos. En el caso de *P. ostreatus* ECS-1123, los porcentajes obtenidos se mantuvieron arriba del 97% IEH, siendo similares con el máximo presentado por el grupo de Reyes (94.7%). Cabe resaltar que la concentración utilizada en el presente experimento fue  $\geq 3$  veces superior a la evaluada por Reyes. Debido a ello, en el presente trabajo se modificó levemente la metodología para la obtención de proteínas miceliales de los hongos notificada por Reyes. Dicha modificación, consistió en la omisión del uso de detergentes e inhibidores proteínicos en la solución tamponada de extracción. Esta modificación se realizó debido a dos razones fundamentales: 1. Para incluir el efecto de enzimas tipo serin proteasas, mismas que son descritas como factores de virulencia importantes en *P. ostreatus* (Genier et al., 2015) y 2. A que se localizó un efecto biológico en huevos de *H. contortus*, utilizando tritón X-100 al 0.1%, una concentración  $>10$  veces menor a la notificada por Reyes y colaboradores (datos no presentados). A pesar de ello, se pudo apreciar que el extracto de *P. ostreatus* no presentó diferencias en su actividad biológica debido al uso u omisión del inhibidor PMSF.

De la misma manera, fue evidente la estabilidad de los compuestos bioactivos del extracto de *P. ostreatus*, manteniendo valores  $\geq 97\%$  IEH entre tratamientos frescos y aquellos conservados a 4°C por un intervalo de 30 días. Este tipo de estabilidad fue observada también

para el extracto crudo de *P. pulmonarius* el cual se mantuvo entre 74.9-81.2% IEH en el extracto íntegro.

Los huevos de *H. contortus* son eliminados, en fase morular o previa, junto con las heces del rumiante infectado. Para el desarrollo embrionario del huevo, el oxígeno es indispensable hasta la formación de la larva en el interior del huevo y su posterior eclosión; proceso que no dura más de 18h en medios líquidos (Veglia, 1916). El huevo, de manera general, contiene al embrión-larva que se encuentra rodeado por tres capas que lo protegen: 1. La capa interna, compuesta principalmente por lípidos y proteínas, conforman una membrana semipermeable a flujos de agua, solventes lipídicos, pequeños iones y gases; 2. La capa intermedia o capa quitinosa, compuesta por complejos de quitina/proteína que garantizan una fortaleza estructural; y 3. La capa externa o capa vitelina, compuesta por lipoproteínas que proveen de una estructura tipo membrana (Gortari y Hours, 2008). Los compuestos activos contra huevos inhiben la eclosión de los huevos, pudiendo perjudicar la supervivencia de las larvas dentro del huevo o bien, interrumpiendo el proceso de eclosión (Salles et al., 2014). Los huevos observados mediante microscopio de campo de luz (10x), mostraron huevos larvados principalmente en los extractos de *P. cornucopiae*, *P. djamor*, *P. eryngii* y *P. ostreatus*; sin embargo, los componentes bioactivos del extracto crudo de *P. pulmonarius* actuaron desde el interior del mismo, destruyendo la larva en formación. Este efecto fue dependiente de la concentración proteica del extracto; ya que dentro de las diluciones, fue posible observar L1 liberadas en el tratamiento. No obstante, estas L1 eclosionadas se encontraron expuestas directamente en el tratamiento y murieron. Los diferentes estadios larvales, están encaminados a adaptarse a diferentes entornos. En los estadios L1, L2 y L4 la larva se mantiene adquiriendo nutrientes mediante alimentación activa; alimentándose de bacterias y *detritus* en los primeros estadios (L1, L2) y fluidos sanguíneos en el tercero (L4).

La L3, por el contrario, no se alimenta sino que vive de reservas adquiridas en estadios previos y se mantiene aislada del exterior dentro de una vaina rígida que le da resistencia a rayos UV, compuestos químicos y daños mecánicos. Esta “armadura”, se compone de proteínas fibrosas como queratina y colágeno, que forman complejos con quitina y otros compuestos liposolubles. Ya que el extracto crudo de *P. pulmonarius* no tuvo efecto contra el estadio L3, la actividad biológica apunta a que las larvas tienen que consumir los compuestos



bioactivos mediante la alimentación. Debido a ello, se cree que los compuestos activos del extracto crudo, actúan a nivel gastrointestinal de la larva.

Metabolitos secundarios, proteasas (colagenasas, serin proteasas), quitinasas, lectinas y pequeñas proteínas abundantes en cisteína se consideran importantes factores de virulencia de hongos nematófagos (Herrera-Estrella et al., 2016). Son alrededor de 200 los compuestos tóxicos a nematodos de origen fúngico (Zhang y Hyde, 2014), entre los cuales figuran el péptido PF1022A y los alcaloides Paraherquamide y Marcfortine A que han servido para el desarrollo de los antihelmínticos semisintéticos para uso animal de última generación (Emodepside, 2007 y Derquantel, 2012; respectivamente) (Epe y Kaminsky, 2013). Otros compuestos de ascomicetos como nafuredin, nafuredin- $\gamma$  y clonostaquidiol, continúan en estudio como terapéuticos animales. Algunos otros como Illinitone, las Omphalotinas A, B, C, D, E, F, G, H, I y Dichomitina B que fueron aislados de basidiomicetos se consideran candidatos para desarrollo de antihelmínticos contra nematodos fitopatógenos (Degenkolb y Vilcinskas, 2016); desconociendo si el efecto contra nematodos se extiende hacia los nematodos parásitos de animales. En este sentido el NGI *H. contortus* es un nematodo modelo que ha sido muy importante para la evaluación de la actividad biológica de nuevos compuestos y el descubrimiento de los nuevos antihelmínticos del mercado; presentando una mayor tasa de éxito que la mayoría de los nematodos parásitos utilizados. Los hongos *Pleurotus* conforman un género que comprende especies comestibles de hongos; sin embargo, desde 1984 el grupo de Thorn y Barron descubrió su capacidad para inmovilizar y digerir nematodos mediante la secreción de toxinas inmovilizantes.

Hasta ahora, son alrededor de 23 especies descritas con actividad nematófaga, tres de las cuales han servido para identificar 9 compuestos bioactivos: 1) Cheimonophyllon E y 2) 5-hydroxymethyl-furancarbaldehyde en *P. eryngii* anteriormente descrito como *P. ferulae* (Li et al., 2007); 3) ácido trans-2-decenedioico en *P. ostreatus* (Kwok et al., 1992) y 4) ácido S-coriólico, 5) ácido linoleico, 6) p-anisaldehído, 7) p-anisil alcohol, 8) 1-(4-methoxyphenyl)-1,2-propanediol, 9) 2-hydroxy-(4'-methoxy)-propiophenone en *P. pulmonarius* (Stadler et al., 1994). Algunas proteínas como las tamavidinas de *P. cornucopiae* y serin proteasas de *P. ostreatus*, han mostrado actividad contra nematodos de vida libre: *C. elegans* y *Panagrellus* sp., respectivamente (Bleuler-Martínez et al., 2012; Genier et al., 2015). Genier y

colaboradores (2015) fueron los primeros en estudiar la actividad proteolítica de *P. ostreatus* contra nematodos de vida libre *P. redivivus*, describiendo que la participación de las enzimas tipo serin proteasa actuaban en un momento posterior a la inmovilización de los nematodos mediante toxinas secretadas por el hongo. En lo referente a la actividad proteolítica contra las larvas, se obtuvo un perfil enzimático que demostró la presencia de algunas serin-proteasas, mismas que se confirmaron a través de un zimograma que presentó halos de digestión en un gel de caseína-SDS-PAGE en condiciones óptimas de actividad proteolítica. La adición del inhibidor de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF por sus siglas en inglés) inhibió completamente la actividad proteolítica, confirmando su hipótesis. Sin embargo, de acuerdo a la revisión de literatura, se ha observado que no existen proteínas notificadas de *Pleurotus* con efectos biológicos contra nematodos parásitos. A pesar de ello, el interés científico sobre el efecto de proteínas y extractos proteicos sobre nematodos parásitos, existe. Tal es el caso de las lectinas de hongos comestibles de *Coprinopsis cinérea* (CCL2, CGL2), *Marasmius oreades* (MOA) y *Aleuria aurantia* (AAL) que han presentado actividad contra larvas de *H. contortus* impidiendo su desarrollo hacia L3 (Heim et al., 2015). Este tipo de proteínas, ya se han utilizado en pruebas con animales parasitados de nematodos gastrointestinales; sin embargo, se han tenido que realizar algunas modificaciones para satisfacer los objetivos planteados por el grupo de investigadores (Deplazes et al., 2016).

En plantas, se ha notificado actividad ovicida por extractos de semillas contra huevos de *H. contortus*. Las plantas descritas se encontraron como especies nativas y exóticas de Brasil (*Albizia lebbbeck*, *Crotalaria spectabilis*, *Ipomoea asarifolia*, *Jatropha curcas*, *Libidibia férrea*, *Moringa oleífera* y *Ricinus communis*) sugiriendo que las proteínas o péptidos podían ser las sustancias activas responsables. En un estudio posterior, se utilizaron extractos de semillas de *Leucaena leucocephala* contra la misma especie parásita, concluyendo que el efecto inhibitorio podría estar relacionado más particularmente con la actividad de proteasas y quitinasas (Soares et al., 2015). Hasta ese momento, no se descartaba la participación de metabolitos secundarios; sin embargo, en el año 2017 se confirmó un efecto contra huevos exclusivo por proteínas contenidas en las fracciones de la planta *Spigelia anthelmia* (Araújo et al., 2017). Los avances más prometedores en esta área, se describen para la proteína Cry5B de *Bacillus thuringiensis*, la cual han planteado administrar como tratamiento antihelmíntico en animales, mediante la transformación de una bacteria grado alimenticio (Durmaz et al., 2015).

En un estudio más reciente, se ha proyectado como una cura contra infecciones por *Ancylostoma* sp., de humanos y otros animales (Hu et al., 2018). A diferencia de proteínas antigénicas derivadas del parásito *H. contortus* (antígenos: derivados de intestino: H-gal-GP, H11, GA1; de superficie de L3; de excreción/secreción; etc.) que sirvieron para la generación de la vacuna Barbervax®; lo que se pretende es encontrar proteínas del tipo Cry5B que tengan selectividad, más no especificidad por especies de nematodos parásitos. En este sentido, los estudios sobre compuestos fúngicos han dejado claro que son una fuente valiosa de productos naturales; y los extractos crudos pueden contener compuestos proteicos valiosos para desarrollo de nuevos antihelmínticos y optimización de estrategias en el control biológico de parásitos.

## 9. Conclusiones

El efecto inhibitorio contra huevos de *H. contortus* por extractos crudos de hongos *Pleurotus*, parece ser una característica del género. Los porcentajes de IEH fueron 53.1% para *P. cornucopiae*; 76.5% para *P. djamor*; 45.51% para *P. eryngii*; 97.6% para *P. ostreatus* y 79.2% para *P. pulmonarius* en los extractos íntegros (sin diluir). Los extractos crudos de *P. ostreatus* y *P. pulmonarius*, además de ser los de mayor actividad, mostraron estabilidad de sus componentes bioactivos; prolongando su actividad biológica por 30d mantenidos en refrigeración a 4°C. Para el caso del extracto de *P. pulmonarius* pudo conservar el 47.8% de su actividad de IEH.

El extracto de *P. pulmonarius*, no limitó su actividad a huevos del parásito, sino que tuvo un efecto letal contra larvas pre-infectantes (L1) presentes en los tratamientos inferiores al 100% de actividad IEH, incluso a concentraciones de 75 µg/mL; así como un efecto letal tipo paralizante contra larvas histiotrópicas L4 (56.9% mortalidad). Las larvas infectantes desenvainadas (L3), por el contrario, no fueron susceptibles a la exposición del extracto crudo de *P. pulmonarius*. Sugiriendo que los componentes bioactivos son no permeables a la epidermis del parásito y que tal vez, la larva tenga que adquirirlos por medio de la alimentación. Los resultados por lo tanto, mostraron evidencia del potencial del extracto crudo de *P. pulmonarius* contra estadios larvales de especies parásitas (con alimentación activa).

Los componentes bioactivos mayoritarios del extracto crudo de *P. pulmonarius* parecen tener naturaleza proteica (péptidos o proteínas), de acuerdo con los resultados obtenidos en el contraste de actividad biológica entre el extracto crudo íntegro a 48 h (56.9-61.2% mortalidad), extractos inactivados por tripsinización (35.3% mortalidad), por calor (16.3% mortalidad) y el extracto hidroalcohólico (14.9% mortalidad). El perfil proteico obtenido de los extractos de *P. pulmonarius* exhibió bandas proteicas de entre 10 y 200 kDa, contrastando con el perfil proteico obtenido del extracto hidroalcohólico, en el cual solo se observó una banda de proteínas. De la misma manera, se presume que las proteínas activas sean diferentes a las del tipo hidrolítico referenciadas anteriormente por el grupo de Genier (2015) y sean más parecidas a la actividad descrita para las lectinas fúngicas (Heim et al., 2015; Sabotic et al., 2016).

## **10. Perspectivas**

El extracto crudo de *P. pulmonarius* ha mostrado componentes bioactivos contra estadios larvales del nematodo parásito *H. contortus*, un nematodo clave en el desarrollo, evaluación y mecanismos de compuestos antihelmínticos. Los alcances del presente proyecto, fueron insuficientes para determinar e identificar el, o los componentes bioactivos del extracto; por lo tanto, se sugiere someter el extracto a un perfil de componentes químicos y proteicos, mediante plataformas cromatográficas y/o espectrométricas. Este paso, es indispensable para confirmar o refutar la hipótesis generada por los datos experimentales aquí obtenidos. De manera complementaria, se sugiere la evaluación del extracto crudo contra especies importantes de nematodos parásitos de plantas, así como otros nematodos de importancia veterinaria. Se espera, que en el futuro existan diversas metodologías y compuestos naturales que puedan sustituir o complementar los compuestos antihelmínticos actuales.

## 11. Referencias

- American Psychological Association. (2010). *Manual de publicaciones de la American Psychological Association (6 ed.)*. D. F., México: Editorial El Manual Moderno.
- Angulo-Cubillán, F. J., García-Coiradas, L., Cuquerella, M., De-la-Fuente, C., y Alunda, J. M. (2007). *Haemonchus contortus*-sheep relationship: a review. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 17(6), 577-587.
- Araújo, S.A., Soares, A.M.dS., Silva, R.C., Júnior, E.B.A., Rocha, C.Q., Ferreira, A.T.dS., ... y Costa-Júnior, L.M. (2017). *In vitro* anthelmintic effects of *Spigelia anthelmia* protein fractions against *Haemonchus contortus*. *PloS ONE*, 12(12), e0189803. Doi 10.1371/journal.pone.0189803
- Barron, G. L., y Thorn, R. G. (1987). Destruction of nematodes by species of *Pleurotus*. *Canadian Journal of Botany*, 65(1), 774-778. Doi: 10.1139/b87-103
- Bellettini, M. B., Fiorda, F. A., Maieves, H. A., Teixeira, G. L., Ávila, S., Hornung, P. S.,... y Ribani, R. H. (2016). Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. *Saudi Journal of Biological Sciences*. Doi: 10.1016/j.sjbs.2016.12.005. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/>
- Berne, S., Križaj, I., Pohleven, F., Turk, T., Maček, P., y Sepčić, K. (2002). *Pleurotus* and *Agrocybe* hemolysins, new proteins hypothetically involved in fungal fruiting. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1570(3), 153-159. Doi: 10.1016/S0304-4165(02)00190-3
- Besier, R. B., Kahn, L. P., Sargison, N. D., y Van-Wyk, J.A. (2016b). Diagnosis, treatment and management of *Haemonchus contortus* in small ruminants. En R. Gasser y G. V. Samson-Himmelstjerna (Eds.), *Advances in Parasitology: Haemonchus contortus and Haemonchosis past, present and future trends vol. 93* (pp. 181-238). Oxford, United Kingdom: Academic press-Elsevier.
- Besier, R. B., Kahn, L. P., Sargison, N. D., y Van-Wyk, J.A. (2016a) The pathophysiology, ecology and epidemiology of *Haemonchus contortus* infection in small ruminants. En R. Gasser y G. V. Samson-Himmelstjerna (Eds.), *Advances in Parasitology: Haemonchus contortus and Haemonchosis past, present and future trends vol. 93* (pp. 095-143). Oxford, United Kingdom: Academic press-Elsevier.
- Bird, D. M., y Opperman, C. H. (2009). The secret (ion) life of worms. *Genome Biology*, 10(1), 205. Doi: 10.1186/gb-2009-10-1-205
- Blackwell, M. (2011). The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98(3), 426-438. Doi: 10.3732/ajb.1000298
- Blaxter, M., y Koutsovoulos, G. (2015). The evolution of parasitism in Nematoda. *Parasitology*, 142(Suppl.1), s26-s39. Doi 10.1017/S0031182014000791
- Bleuler-Martínez, S., Butschi, A., Garbani, M., Wälti, M. A., Wohlschlager, T., Potthoff, E.,... y Künzler, M. (2011). A lectin-mediated resistance of higher fungi against predators and parasites. *Molecular Ecology*, 20(14), 3056-3070. Doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05093.x.

- Bleuler-Martínez, S., Schmieder, S., Aebi, M., y Künzler, M. (2012). Biotin-binding proteins in the defense of mushrooms against predators and parasites. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(23), 8485-8487. Doi 10.1128/AEM.02286-12
- Bliss, T. J., Dillman, A., Russell, R., Anderson, M., Yourick, D., Jett, M., y Adams, B. J. (2007-2017). *Nematodes: model organisms in high school biology*. California, Estados Unidos de América: Researchgate. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/220032980>
- Bongers, T., y Ferris, H. (1999). Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. *Trends in Ecology and Evolution*, 14(6), 224-228. Doi: 10.1016/S0169-5347(98)01583-3
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Burgess, R. R. (2009). Chapter twenty. Protein precipitation techniques. En J. N. Abelson y M. I. Simon (Eds. In chief). *Methods in enzymology, guide to protein purification (2 ed.) vol. 473* (pp. 331-342). Oxford, United Kingdom: Elsevier Science and Technology.
- Cable, J., Barber, I., Boag, B., Ellison, A. R., Morgan, E. R., Murray, K.,... y Booth, M. (2017). Global change, parasite transmission and disease control: lessons from ecology. *Philosophical transactions of the royal society B*, 372(1719), 01-17. Doi: 10.1098/rstb.2016.0088
- Campbell, N. A., y Reece, J. B. (2009). *Biology: Concepts and connections (6 ed.)*. Pearson / Benjamin Cummings. San Francisco, United States of America: Pearson / Benjamin Cummings.
- Chagas, A. C. S., Niciura, S. C. M., y Molento, M. B. (Ed.). (2011). *Manual prático: metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes*. Brasília DF, Brasil: Embrapa Informação Tecnológica.
- Chen, Z. X., Chen, S. Y., y Dickson, D. W. (2004). *Nematology: Advances and Perspectives vol. 1, Nematode Morphology, Physiology and Ecology*. Wallingford, United Kingdom: CABI.
- Chowdhury, H. M. M., Kubra, K., y Ahmed, S. R. (2015). Screening of antimicrobial, antioxidant properties and bioactive compounds of some edible mushrooms cultivated in Bangladesh. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14(8), 01-06. Doi: 10.1186/s12941-015-0067-3
- Ciancio, A., y Mukerji, K. G. (Eds.). (2008). *Integrated management and biocontrol of vegetable and grain crops nematodes*. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Cléménçon, H. (2004). *Cytology and plectology of the Hymenomycetes*. Berlin, Germany: Ernest E. Emmett.
- Cohen, R., Persky, L., y Hadar, Y. (2002). Biotechnological applications and potential of Wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied microbiology and Biotechnology*, 58(5), 582-594. Doi: 10.1007/s00253-002-0930-y
- Comans-Pérez, R., Aguilar-Marcelino, L., Mendoza, D.-G. P., Sánchez, J. E., y López-Arellano, M. E. (2014). *In vitro* lethal capability of ten strains of edible mushrooms against *Haemonchus contortus* (Nematoda) infective larvae. En M. Singh (president), *Proceedings of 8<sup>th</sup>*

*International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8) (vol. 1 and 2)*. New Delhi, India.

- Conrad, F., y Rüdiger, H. (1994). The lectin from *Pleurotus ostreatus*: purification, characterization and interaction with phosphatase. *Pergamon*, 36(2), 277-283. Doi: 10.1016/S0031-9422(00)97061-4
- Cuéllar, O. J. A. (2009). Nuevas opciones para el control de nematodos gastroentéricos en ovinos. Recuperado de: <http://www.iberovinos.com/>
- Cuevas, P. E. J. (2013). *Aplicación de la proteína Cry11Aa de Bacillus thuringiensis serovar. israelensis como agente terapéutico contra la hemoncosis en ovinos Pelibuey bajo condiciones de campo* (tesis de pregrado). Universidad Politécnica del Estado de Morelos, Jiutepec, México.
- De Ley, P., y Blaxter, M. (2002). Systematic position and phylogeny. En D. L. Lee (Ed.). *The biology of nematodes* (pp. 01-58). London, United Kingdom: Taylor & Francis.
- Deepalakshmi, K., y Mirunalini, S. (2014a). Toxicological assessment of *Pleurotus ostreatus* in Sprague Dawley rats. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 4(3), 139-145. Doi: 10.4103/2231-0738.132665
- Deepalakshmi, K., y Mirunalini, S. (2014b). *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. *Journal of Biochemical Technology*, 5(2), 718-726.
- Degenkolb, T., y Vilcinskis, A. (2016). Metabolites from nematophagous fungi and nematicidal natural products from fungi as alternatives for biological control. Part II: metabolites from nematophagous basidiomycetes and non-nematophagous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(9), 3813-3824. Doi: 10.1007/s00253-015-7234-5
- Deplazes, P. (Project leader). (2016). Fungal lectins as leads for the vaccination of sheep against *Haemonchus contortus* and other nematodes. Project 16367: University of Zurich.
- Dunaevsky, Y. E., Popova, V. V., Semenova, T. A., Beliakova, G. A., y Belozersky, M. A. (2014). Fungal inhibitors of proteolytic enzymes: classification, properties, possible biological roles, and perspectives for practical use. *Biochimie*, 101, 10-20. Doi: 10.1016/j.biochi.2013.12.007
- Durmaz, E., Hu, Y., Aroian, R.V. y Klaenhammer, T.R. (2016). Intracellular and extracellular expression of *Bacillus thuringiensis* crystal protein Cry5B in *Lactococcus lactis* for use as an anthelmintic. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(4), 1286-1294. Doi 10.1128/AEM.02365-15
- El-Fakharany, E. M., Haroun, B. M., Ng, T., y El-Rashdy, M. R. (2010). Oyster mushroom laccase inhibits hepatitis C virus entry into peripheral blood cells and hepatoma cells. *Protein and Peptide Letters*, 17(8), 1031-1039. Doi: 10.2174/092986610791498948
- Epe, C., y Kaminsky, R. (2013). New advancement in anthelmintic drugs in veterinary medicine. *Trends in Parasitology*, 29(3), 129-134. Doi 10.1016/j.pt.2013.01.001
- FAO. (2013). *Resistencia a los antiparasitarios: estado actual con énfasis en América Latina; estudio FAO producción y sanidad animal* (157). Recuperado de: <http://www.fao.org/>
- FAO/OMS. (1989). Pautas para predecir la ingesta de residuos de plaguicidas en los alimentos. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 106(3), 214-223.



- Ferguson, B. A., Dreisbach, T. A., Parks, C. G., Filip, G. M., y Schmitt, C. L. Coarse-scale population structure of pathogenic *Armillaria* species in a mixed-conifer forest in the Blue Mountains of northeast Oregon. *Canadian Journal of Forest Research*, 33(4), 612-623. Doi: 10.1139/X03-065
- Frangež, R., Šuput, D., Molgó, J., y Benoit, E. (2017). Ostreolysin A/ Pleurotolysin B and Equinatoxins: structure, function and pathophysiological effects of these pore-forming proteins. *Toxins*, 9(4), 128-138. Doi: 10.3390/toxins9040128
- Freckman, D. W., Mankau, R., y Ferris, H. (1975). Nematode community structure in desert soils: nematode recovery. *Journal of Nematology*, 7(4), 343-346.
- Gao, W., Sun, Y., Chen, S., Zhang, J., Kang, J., Wang, Y.,... y Kang, Y. (2013). Mushroom lectin enhanced immunogenicity of HBV DNA vaccine in C57BL/6 and HBsAg-transgenic mice. *Vaccine*, 31(18), 2273-2280. Doi: 10.1016/j.vaccine.2013.02.062
- Garcia, L. A. D.-C., Hiura, E., De-Freitas, S. F. E., Abreu, D.-F. L., Sena, C. C., Magri, F. C.,... y Braga, F. R. (2015). Predatory activity of the fungus *Pleurotus eryngii* on *Ancylostoma caninum* infective larvae. *Symbiosis*. Recuperado de <https://symbiosisonlinepublishing.com/>
- Geary, T.G. (2016). *Haemonchus contortus*: applications in drug discovery. En R. Gasser y G. V. Samson-Himmelstjerna (Eds.), *Advances in Parasitology: Haemonchus contortus and Haemonchosis past, present and future trends vol. 93* (pp. 429-463). Oxford, United Kingdom: Academic press-Elsevier.
- Gebremikael, M. T., Steel, H., Buchan, D., Bert, W., y De-Neve, S. (2016). Nematodes enhance plant growth and nutrient uptake under C and N-rich conditions. *Scientific Reports*, 6(32862), 01-10. Doi: 10.1038/srep32862
- Geerts, S., y Gryseels, B. (2000). Drug resistance in human helminths: current situation and lessons from livestock. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(2), 207-222.
- Geerts, S., y Gryseels, B. (2001). Anthelmintic resistance in human helminths: a review. *Tropical Medicine and International Health*, 6(11), 915-921.
- Genier, H. L. A., Soares, F. E. D.-F., De-Queiroz, J. H., Gouveia, A. D.-S., Araújo, J. V., Braga, F.R.,... y Kasuya, M. C. M. (2015). Activity of the fungus *Pleurotus ostreatus* and of its proteases on *Panagrellus* sp. larvae. *African Journal of Biotechnology*, 14(17), 1496- 1503. Doi: 10.5897/AJB2015.14447
- Giesbrecht, F. G., y Gumpertz, M. L. (2004). *Planning, construction, and design of comparative experiments*. Hoboken, United States of America: John Wiley and Sons.
- Gilleard, J.S. (2013). *Haemonchus contortus* as a paradigm and model to study anthelmintic drug resistance. *Parasitology*, 140(12), 1506-1522. Doi: 10.1017/S0031182013001145
- González, G. R., Córdova, P. C., Torres, H. G., Mendoza, D.-G. P., y Arece, G. J. (2011). Prevalencia de parásitos gastrointestinales en ovinos sacrificados en un rastro de Tabasco, México. *Veterinaria México*, 42(2), 125-135.
- González, R. J. L. (2007). Caracterización fenotípica de corderos Pelibuey resistentes y susceptibles a *Haemonchus contortus* bajo condiciones naturales (tesis de pregrado). Benemérita Universidad de Puebla, Puebla, México.

- Göransson, U., Burman, R., Gunasekera, S., Strömstedt, A. A., y Rosengren, K. J. (2012). Circular proteins from plants and fungi. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(32), 27001-27006. Doi: 10.1074/jbc.R111.300129
- Gortari, M. C., y Hours, R. A. (2008). Fungal chitinases and their biological role in the antagonism onto nematode eggs. A review. *Mycological Progress*, 7(4), 221-238. Doi 10.1007/s11557-008-0571-3
- Gunn, A. y Pitt, S. J. (Eds.). (2012). *Parasitology: an integrated approach*. Chichester, United Kingdom: John Wiley and Sons Ltd.
- Harder, A. (2016). The biochemistry of *Haemonchus contortus* and other parasitic nematodes. En R. Gasser y G. V. Samson-Himmelstjerna (Eds.), *Advances in Parasitology: Haemonchus contortus and Haemonchosis past, present and future trends vol. 93* (pp. 01-26). Oxford, United Kingdom: Academic press-Elsevier.
- Hassan, M. A. A., Rouf, R., Tiralongo, E., May, T. W., y Tiralongo, J. (2015). Mushroom lectins: specificity, structure and bioactivity relevant to human disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(4), 7802-7838. Doi: 10.3390/ijms16047802
- Hassan, M. A., Pham, T. H., Shi, H., y Zheng, J. (2013). Nematodes threats to global food security. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B – Soil & Plant Science*, 63(5), 420-425. Doi: 10.1080/09064710.2013.794858
- Hawksworth, D. L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*, 95(6), 641-655. Doi: 10.1016/S0953-7562(09)80810-1
- Heim, C., Hertzberg, H., Butschi, A., Bleuler-Martinez, S., Aebi, M., Deplazes, P.,... y Štefanić, S. (2015). Inhibition of *Haemonchus contortus* larval development by fungal lectins. *Parasites and Vectors*, 8(425), 01-10. Doi: 10.1186/s13071-015-1032-x
- Henrioud, A. N. (2011). Towards sustainable parasite control practices in livestock production with emphasis in Latin America. *Veterinary Parasitology*, 180(1-2), 02-11. Doi: 10.1016/j.vetpar.2011.05.026
- Herrera-Manzanilla, F. A., Ojeda-Robertos, N. F., González-Garduño, R., Cámara-Sarmiento, R., y 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(2017), 29-33. Doi: 10.1016/j.vprsr.2017.04.007
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E.,... y Lumbsch, H. T. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(5), 509-547. Doi: 10.1016/j.mycres.2007.03.004
- Hibbett, D. S., y Thorn, R. G. (1994). Nematode-trapping in *Pleurotus tuberregium*. *Mycological Society of America*, 86(5), 696-699. Doi: 10.2307/3760542
- Hoa, H. T., y Wang, C. L. (2015). The effects of temperature and nutritional conditions on mycelium growth of two oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). *Mycobiology*, 43(1), 14-23. Doi: 10.5941/MYCO.2015.43.1.14
- Hoste, H., Torres-Acosta, J. F. J., Quijada, J., Chan-Perez, I., Dakheel, M. M., Kommuru, D. S.,... y Terril, T. H. (2016). Interactions between nutrition and infections with *Haemonchus contortus* and related gastrointestinal nematodes in small ruminants. En R. Gasser y G. V. Samson-

- Himmelstjerna (Eds.), *Advances in Parasitology: Haemonchus contortus and Haemonchosis past, present and future trends vol. 93* (pp. 239-351). Oxford, United Kingdom: Academic press-Elsevier.
- Hu, Y., Nguyen, T.-T., Lee, A.C.Y., Urban Jr., J.F., Miller, M.M., Zhan, B., ... y Aroian, R.V. (2018). *Bacillus thuringiensis* Cry5B protein as a new pan-hookworm cure. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 8(2), 287-294. Doi 10.1016/j.ijpddr.2018.05.001
- Hubert, J., y Kerboeuf, D. (1992). A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Veterinary Record*, 130 (20), 442-446. Doi: 10.1136/vr.130.20.442
- Huerta, P. G. (2001). II. Generalidades sobre los hongos, con énfasis en los basidiomicetos. En J. E. Sánchez y D. Royse (Eds.), *La biología y el cultivo de Pleurotus spp. (1 ed.)* (pp. 27-48). San Cristóbal de las Casas, México: ECOSUR y UTEHA Noriega Editores.
- Jasso-Díaz, G., Mendoza, D.G.P., Torres, H.G., López, A.M.E., Aguilar, M.L., Ramírez, B.J.E.,... y Sánchez A.H. (2014). *Haemonchus contortus* egg hatching inhibition by *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* mycelia bio-molecules. En A. Flisser (Presidencia), *Ancient parasites, old hosts, new knowledge... speaks for itself*. Presentado en XIII<sup>th</sup> International Congress of Parasitology, Mexico City, Mexico.
- Jo, W.-S., Hossain, M. A., y Park, S.-C. (2014). Toxicological profiles of poisonous, edible, and medicinal mushrooms. *Mycobiology*, 42(3), 215-220. Doi: 10.5941/MYCO.2014.42.3.215
- Karssen, G., y Moens, M. (2006). Root-knot nematodes. En R. N. Perry y M. Moens (Eds.), *Plant Nematology 1 ed.* (pp. 59-88). Oxford, Reino Unido: CABI Publishing.
- Kawagishi, H., Suzuki, H., Watanabe, H., Nakamura, H., Sekiguchi, T., Murata, T.,... y Nagata, T. (2000). A lectin from an edible mushroom *Pleurotus ostreatus* as a food intake-suppressing substance. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1474(3), 299-308.
- Khan, M. A., y Tania, M. (2012). Nutritional and medicinal importance of *Pleurotus* mushrooms: an overview. *Food Reviews International*, 28(3), 313-329. Doi: 10.1080/87559129.2011.637267
- Kibar, B., y Pekşen, A. (2008). Modelling the effects of temperature and light intensity on the development and yield of different *Pleurotus* species. *Agricultura Tropica et Subtropica*, 41(2), 68-73.
- Kobayashi, Y., y Kawagishi, H. (2014). Chapter 2. Fungal lectins: a growing family. En J. Hirabayashi (Ed.), *Lectins: Methods and protocols, methods in molecular biology vol. 1200* (pp. 15-38). New York, United States of America: Springer Science + Business Media.
- Kogure, T. (1975). On the specificity of mushroom *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus spodoleucus* extracts. *Vox Sanguinis*, 29(3): 221-227.
- Kotze, A. C., y Prichard, R. K. (2016). Anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus*: history, mechanism and diagnosis. En R. Gasser y G. V. Samson-Himmelstjerna (Eds.), *Advances in Parasitology: Haemonchus contortus and Haemonchosis past, present and future trends vol. 93* (pp. 397-428). Oxford, United Kingdom: Academic press- Elsevier.

- Kumar, N., Shankar, R. T. K., Varghese, A., y Singh R. V. (2013). Internal parasite management in grazing livestock. *Journal of Parasitic Diseases*, 37(2), 151-157. Doi: 10.1007/s12639-012-0215-z
- Künzler, M. (2015). Hitting the sweet spot: glycans as targets of fungal defense effector proteins. *Molecules*, 20(5), 8144-8167. Doi: 10.3390/molecules20058144
- Kwok, O. C. H., Plattner, R., Weisleder, D., y Wicklow, D. T. (1992). A nematicidal toxin from *Pleurotus ostreatus* NRRL3526. *Journal of Chemical Ecology*, 18(2), 127-136. Doi: 10.1007/BF00993748
- Lanusse, C. E., Alvarez, L. I., y Lifschitz, A. L. (2016). Gaining insights into the pharmacology of anthelmintics using *Haemonchus contortus* as a model nematode. En R. Gasser y G. V. Samson-Himmelstjerna (Eds.), *Advances in Parasitology: Haemonchus contortus and Haemonchosis past, present and future trends vol. 93* (pp. 465-518). Oxford, United Kingdom: Academic press-Elsevier.
- Larsen, M., y Nansen, P. (1991). Ability of the fungus *Pleurotus pulmonarius* to immobilize preparasitic nematode larvae. *Research in Veterinary Science*, 51(3), 246-249. Doi 10.1016/0034-5288(91)90071-U
- Li, G. H., y Zhang, K. Q. (2014). Nematode-toxic fungi and their nematicidal metabolites. En K. Q. Zhang y K. D. Hyde (Eds.), *Nematode-trapping fungi, fungal diversity research series 23* (pp. 313-375). Dordrecht, The Netherlands: Springer Science + Business Media B. V.
- Li, G., Wang, X., Zheng, L., Li, L., Huang, R., y Zhang, K. (2007). Nematicidal metabolites from the fungus *Pleurotus ferulae* Lenzi. *Annals of Microbiology*, 57(4), 527-529. Doi 10.1007/BF03175350
- Liébano, H. E. (2004). *Diagnóstico y control de los nematodos gastrointestinales de los rumiantes en México (libro técnico No. 1)*. Jiutepec, México: CENID-PAVET/ INIFAP.
- Liébano, H. E. (2011). Capítulo 16: Ecología de larvas de nematodos gastrointestinales de bovinos, ovinos y caprinos. En H. Quiroz, J. A. Figueroa, F. Ibarra y M. E. López (Eds.), *Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos (1 ed.)* (pp. 254-272). D. F., México.
- Liébano, H. E., Vázquez, P. V., y Fernández, R. M. (1998). Sobrevivencia de larvas infectantes de *Haemonchus contortus* en un clima subcálido subhúmedo en México. *Veterinaria México*, 29(3), 245-249.
- López, A. M. E., Mendoza, D. G. P., Aguilar, M. L., y Liébano, H. E. (2010). *Buenas prácticas en el manejo de antihelmínticos para el control de parásitos en rumiantes (folleto técnico No. 8)*. Jiutepec, México: CENID-PAVET/ INIFAP.
- Luan, R., Liang, Y., Chen, Y., Liu, H., Jiang, S., Che, T.,... y Sun, H. (2010). Opposing developmental functions of *Agrocybe aegerita* galectin (AAL) during mycelia differentiation. *Fungal Biology*, 114(8), 599-608. Doi: 10.1016/j.funbio.2010.05.001
- Mafoun, P., Johari, H., Soltani, M., Malik, R., Othman, N. Z., y El-Enshasy, H. A. (2015). The edible mushroom *Pleurotus* spp.: I. Biodiversity and nutritional values. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 4(1), 67-83.

- Martínez, M. I., y Cruz, R. M. (2009). The use of agriculture and livestock chemical products in the cattle-ranching area of Xico, central Veracruz Mexico, and their possible environmental impact. *Acta Zoológica Mexicana*, 25(3), 637-681.
- Masri, H. J., Maftoun, P., Malek, R. A., Boumehira, A. Z., Pareek, A., Hanapi, S. Z.,... y El-Enshasy H. (2017). The edible mushroom *Pleurotus* spp.: II. Medicinal values. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 6(1), 01-11.
- Mattos-Shipley, K. M. J., Ford, K. L., Alberti, F., Banks, A. M., Bailey, A. M., y Foster, G. D. (2016). The good, the bad and the tasty: the many roles of mushrooms. *Studies in Mycology*, 85(1), 125-157. Doi: 10.1016/j.simyco.2016.11.002
- Mekonen, S., Petros, I., y Hailemariam, M. (2017). The role of Nematodes in the processes of soil ecology and their use as bioindicators. *Agriculture and Biology Journal Of North America*, 8(4), 132-140. Doi: 10.5251/abjna.2017.8.4.132.140
- Meldal, B. H. M., Debenham, N. J., De Ley, P., De Ley I. T., Vanfleteren, J. R., Vierstraete, A. R.,... y Lamshead, P. J. D. (2007). An improved molecular phylogeny of the Nematoda with special emphasis on marine taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42(3), 622-636. Doi: 10.1016/j.ympev.2006.08.025
- Miller, J.E., y Horohov, D.W. (2006). Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. *Journal of Animal Science*, 84(13\_suppl), 124-132. Doi: 10.2527/2006.8413\_supplE124x
- Neher, D. A. (2001). Role of Nematodes in soil health and their use as indicators. *Journal of Nematology*, 33(4), 161-168.
- Nicol, J. M., Turner, S. J., Coyne, D. L., Den-Nijs, L., Hockland, S., y Maafi, Z. T. (2011). Current nematode threats to world agriculture. En J. Jones, G. Gheysen y C. Fenoll (Eds.), *Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions* (pp. 21-43). Berlin, Germany: Springer Science and Business Media.
- Okorie, C. C., Ononuju, C. C., y Okwujiako, I. A. (2011). Management of *Meloidogyne incognita* with *Pleurotus ostreatus* and *P. tuberregium* in soybean. *International Journal of agriculture and Biology*, 13(3), 401-405.
- Parihar, S., Pithawala, E. A., y Modi, H. A. (2016). Evaluation of bioactive functional compound of edible mushroom *Pleurotus ostreatus* by Ft-Ir spectrum. *International Journal of Innovative Knowledge Concepts*, 2(1), 2454-2415.
- Partida, D.-L.-P. J. A., Braña, V. D., Jiménez, S. H., Ríos, R. F. G., y Buendía, R. G. (2013). *Manual de producción de carne ovina (libro técnico No. 5)*. Colón, México: CENID-FyMA/ INIFAP.
- Piska, K., Sułkowska-Ziaja, K., y Muszyńska, B. (2017). Edible mushroom *Pleurotus ostreatus* (Oyster mushroom)-its dietary significance and biological activity. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, 16(1), 151-156.
- Püntener, W. (1981). *Manual for field trials in plant protection (2 ed.)*. Basle, Switzerland: Ciba-Geigy, Ltd.
- Quist, C. W., Gort, G., Mulder, C., Wilbers, R. H. P., Termorshuizen, A. J., Bakker, J., y Helder, J. (2017). Feeding preference as a main determinant of microscale patchiness among terrestrial nematodes. *Molecular Ecology Resources, unpublished*. Doi: 10.1111/1755-0998.12672

- Reyes, G. D. E., Mendoza, G. P., Olmedo, J. A., López, A. M. E., Maza, L. J., Ramírez, V. G.,...y Sánchez, J. E. (2015). Efecto ovicida de proteínas obtenidas de los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Arthrotrrys oligospora* contra huevos de *Haemonchus contortus*. En L. Flores (Presidencia), *Innovación sustentable para el sector pecuario*. Congreso llevado a cabo en la LI Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, Toluca, México.
- Rinaldi, L., Catelan, D., Musella, V., Cecconi, L., Hertzberg, H., Torgerson, P. R.,... y Cringoli, G. (2015). *Haemonchus contortus*: spatial risk distribution for infection in sheep in Europe. *Geospatial Health*, 19(2), 325-331. Doi: 10.4081/gh.2015.355
- Rodríguez-Vivas, R. I., Grisi, L., Pérez D.-L. A. A., Silva, V. H., Torres-Acosta, J. F. D.-J., Fragoso, S. H.,... y García, C. D. (2017). Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8(1), 61-74. Doi: 10.22319/rmcp.v8i1.4305
- Roeber, F., Jex, A. R., y Gasser, R. B. (2013). Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance- an Australian perspective. *Parasites and Vectors*, 6(153), 1-13.
- Royse, D. J., y Sánchez, V. J. E. (2001). I. La importancia del cultivo de *Pleurotus* spp. Estadísticas mundiales de producción con énfasis en Hispanoamérica. En J. E. Sánchez y D. Royse (Eds.), *La biología y el cultivo de Pleurotus spp. (1 ed.)* (pp. 17-26). San Cristóbal de las Casas, México: ECOSUR y UTEHA Noriega Editores.
- Rühl, M., Fischer, C., y Kües, U. (2008). Ligninolytic enzyme activities alternate with mushroom production during industrial cultivation of *Pleurotus ostreatus* on wheat-straw-based substrate. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 2(4), 478-492.
- Sabotiç, J., Ohm, R. A., y Künzler, M. (2016). Entomotoxic and nematotoxic lectins and protease inhibitors from fungal fruiting bodies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(1), 91-111. Doi: 10.1007/s00253-015-7075-2
- Sabotiç, J., y Kos, J. (2012). Microbial and fungal protease inhibitors- current and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(4), 1351-1375. Doi: 10.1007/s00253-011-3834-x
- Salles, H.O., Braga, A.C.L., Nascimento, M.T.dS.C., Sousa, A.M.P., Lima, A.R., Vieira, L.dS., ... y Andrade, L.B.dS. (2014). Lectin, hemolysin and protease inhibitors in seed fractions with ovicidal activity against *Haemonchus contortus*. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 23(2), 136-143.
- Sangster, N.C., Cowling, A., y Woodgate, R.G. (2018). Ten events that defined anthelmintic resistance research. *Trends in Parasitology*, 34(7), 553-563. Doi 10.1016/j.pt.2018.05.001
- Satou, T., Kaneko, K., Li, W., y Koike, K. (2008). The toxin produced by *Pleurotus ostreatus* reduces the head size of nematodes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(4), 574-576.
- Schmelkes, C., y Elizondo, S. N. (2010). *Manual para la presentación de anteproyectos e informes de investigación (3 ed.)*. D. F., México: Oxford University Press México.
- Soares, A.M.dS., Araújo, S.A., Lopes, S.G., y Junior, L.M.C. (2015). Anthelmintic activity of *Leucaena leucocephala* protein extracts on *Haemonchus contortus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 24(4), 396-401. Doi 10.1590/S1984-29612015072

- Song, D., Pan, K., Tariq, A., Sun, F., Li, Z., Sun, X.,... y Wu, X. (2017). Large-scale patterns of distribution and diversity of terrestrial nematodes. *Applied Soil Ecology*, 114(1), 161-169. Doi: 10.1016/j.apsoil.2017.02.013
- Stadler, M., Mayer, A., Anke, H., y Sterner, O. (1994). Fatty acids and other compounds with nematicidal activity from cultures of Basidiomycetes. *Planta Medica*, 60(2), 128-132. Doi 10.1055/s-2006-959433
- Stutz, K., Kaech, A., Aebi, M., Künzler, M., y Hengartner, M. O. (2015). Disruption of the *C. elegans* intestinal brush border by the fungal lectin CCL2 phenocopies dietary lectin toxicity in mammals. *Plos One*, 10(6), 01-23. Doi: 10.1371/journal.pone.0129381
- Sun, Y., y Liu, J. (2008). Purification, structure and immunobiological activity of a water-soluble polysaccharide from the fruiting body of *Pleurotus ostreatus*. *Bioresource Technology*, 100(2), 983-986. Doi: 10.1016/j.biortech.2008.06.036
- Taylor, M. A., Coop, R. L., y Wall, R. L. (2016). *Veterinary parasitology 4 (ed.)*. Chichester, United Kingdom: Wiley Blackwell.
- Terrill, T.H., Miller, J. E., Burke, J. M., Mosjidis, J. A., y Kaplan, R. M. (2012). Experiences with integrated concepts for the control of *Haemonchus contortus* in sheep and goats in the United States. *Veterinary Parasitology*, 186(1-2), 28-37. Doi: 10.1016/j.vetpar.2011.11.043
- Thorn, G., y Tsuneda, A. (1993). Interactions between *Pleurotus* species, nematodes, and bacteria on agar and in Wood. *Nippon Kingakkai Kaiho*, 34(4), 449-464.
- Thorn, R. G., y Barron, G. L. (1984). Carnivorous mushrooms. *Science*. 224(4644), 76-78. Doi: 10.1126/science.224.4644.76
- Torgerson, P. R., y Macpherson, C. N. L. (2011). The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: Global trends. *Veterinary Parasitology*, 182(1), 79-95. Doi: 10.1016/j.vetpar.2011.07.017
- Torres-Acosta, J. F. J., Dzul-Canche, U., Aguilar-Caballero, A.J., y Rodríguez-Vivas, R. (2003). Prevalence of benzimidazole resistant nematodes in sheep flocks in Yucatán, México. *Veterinary Parasitology*, 114(1), 33-42. Doi: 10.1016/S0304-4017(03)00076-1
- Truong, B.-N., Okazaki, K., Fukiharu, T., Takeuchi, Y., Futai, K., Le, X.-T., y Suzuki, A. (2007). Characterization of the nematocidal toxocyst in *Pleurotus* subgen. *Coremiopleurotus*. *Mycoscience*, 48(4), 222-230. Doi: 10.1007/S10267-007-0358-4
- Valverde, M. E., Hernández-Pérez, T., y Paredes-López, O. (2015). Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. *International Journal of Microbiology*, 2015. Doi: 10.1155/2015/376387
- Vamanu, E. (2012). *In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of ethanolic extract of lyophilized mycelium of *Pleurotus ostreatus* PQMZ91109. *Molecules*, 17(1), 3653-3671. Doi: 10.3390/molecules17043653
- Vázquez, P. V. M., Flores, C. J., Santiago, V. C., Herrera, R. D., Palacios, F. A., Liéban, H. E., y Pelcastre, O. A. (2004). Frecuencia de nematodos gastroentéricos en bovinos de tres áreas de clima subtropical húmedo de México. *Técnica Pecuaria en México*, 42(2), 237-245. Doi: 10.22319/rmcp.v42i2.1414

- Veglia, F. (1916). *The anatomy and life-history of the Haemonchus contortus (Rud)*. Onderstepoort, South Africa: Veterinary Research Laboratories.
- Waller, P. J. (1999). International approaches to the concept of integrated control of nematode parasites of livestock. *International Journal of Parasitology*, 29(1), 155-164. Doi: 10.1016/S0020-7519(98)00178-7
- Waller, P. J., Echevarria, F., Eddi, C., Maciel, S., Nari, A., y Hansen, J. W. (1996). The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: General overview. *Veterinary Parasitology*, 62(3-4), 181-187.
- Waller, P.J., y Chandrawathani, P. (2005). *Haemonchus contortus*: parasite problem No.1 from tropics-Polar circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. *Tropical Biomedicine*, 22(2), 131-137.
- Wang, H., Gao, J., y Ng, T. B. (2000). A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 275(3), 810-816. Doi: 10.1006/bbrc.2000.3373
- Wang, M., Triguéros, V., Paguereau, L., Chavant, L., y Fournier, D. (2002). Proteins as active compounds involved in insecticidal activity of mushroom fruitbodies. *Journal of Economic Entomology*, 95(3), 603-607.
- Xu, X., Yan, H., Chen, J., y Zhang, X. (2011). Bioactive proteins from mushrooms. *Biotechnology Advances*, 29(6), 667-674. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.05.003
- Zhang, K.-Q., y Hyde, K. D. (Eds.). (2014). *Nematode-trapping fungi, fungal diversity research series 23*. Doi: 10.1007/978-94-017-8730-7\_1
- Zhang, Z.-Q. (2013). Animal biodiversity: an update of classification and diversity in 2013. En Z.-Q., Zhang (Ed.), *Animal biodiversity: an outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness (Addenda 2013)*. (pp. 05-11). Auckland, New Zealand: Magnolia Press.