



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Maestría en Recursos Bióticos

## **Potencial antihelmíntico de extractos de plantas silvestres y cultivadas mediante el uso del nematodo modelo *Caenorhabditis elegans***

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencias

**Presenta:**

Denia María Piña Vázquez

**Codirección de tesis**

Fausto Arellano Carbajal y Luis Antonio Salazar Olivo

Fausto Arellano Carbajal

Presidente

\_\_\_\_\_

Firma

Luis Antonio Salazar Olivo

Secretario

\_\_\_\_\_

Firma

Maricela Gómez Sánchez

Vocal

\_\_\_\_\_

Firma

Karina A. Acevedo Whitehouse

Vocal

\_\_\_\_\_

Firma

Gabriela Aguilar Tipacamú

Vocal

\_\_\_\_\_

Firma

\_\_\_\_\_  
Dra. Margarita García Gasca  
Director de la Facultad de Ciencia Naturales

\_\_\_\_\_  
Dr. Irineo Torres Pacheco  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro., México  
Diciembre del 2014



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Maestría en Recursos Bióticos

## Potencial antihelmíntico de extractos de plantas silvestres y cultivadas mediante el uso del nematodo modelo *Caenorhabditis elegans*

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencias

### Presenta:

Denia María Piña Vázquez

### Codirección de tesis

Fausto Arellano Carbajal y Luis Antonio Salazar Olivo

Fausto Arellano Carbajal

Presidente

Firma

Luis Antonio Salazar Olivo

Secretario

Firma

Maricela Gómez Sánchez

Vocal

Firma

Karina A. Acevedo Whitehouse

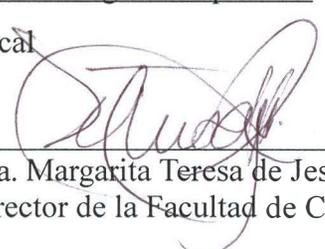
Vocal

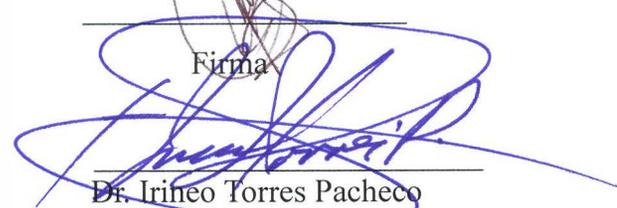
Firma

Gabriela Aguilar Tipacamú

Vocal

Firma

  
Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca  
Director de la Facultad de Ciencia Naturales

  
Dr. Irineo Torres Pacheco  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro., México  
Diciembre del 2014

## RESUMEN

La alta prevalencia de resistencia hacia los fármacos antiparasitarios, ha surgido en nematodos que parasitan especies de importancia económica, (Sangster y Gill, 1999). La evaluación de la capacidad antihelmíntica de plantas, es una de las alternativas que se investigan como solución a la problemática de resistencia a todos los tipos de fármacos antihelmínticos de amplio espectro ampliamente utilizados en medicina veterinaria y humana disponibles actualmente. En el presente trabajo se evaluó el potencial antihelmíntico de extractos acuosos de tres plantas cultivadas (*Dysphania ambrosioides*, *Persea americana* y *Psidium guajava*) y una silvestre (*Marrubium vulgare*), mediante el uso del nematodo modelo *C. elegans*. Se realizó trabajo de campo para la colecta del material botánico, el cual fue tratado para obtener extractos de tipo acuoso mismos que se utilizaron para realizar bioensayos donde se determinó si modifican el comportamiento de locomoción y reproducción de la cepa silvestre y dos cepas mutantes (CB193 y DA1371) de *C. elegans*. Las variables de respuesta fueron: número de nematodos paralizados y de nematodos que presentan movimiento atípico así como número de coleteos y porcentaje de oviposición. Es contundente el efecto paralizante que ejerce el extracto de *Psidium guajava* (PG), sobre la cepa N2 de *C. elegans* comparado con las demás plantas. Desde 1 hasta 25mg/ml la parálisis de los nematodos es significativamente mayor ( $p < 0.01$ ) que en el control negativo (M9). El resto de las plantas, ocasionan que los nematodos se muevan atípicamente, sin embargo los nematodos no alcanzan la parálisis en el tiempo establecido para la evaluación (8 horas). PG inhibe la locomoción de las cepas N2, CB193 (resistente a Levamisol) y DA1371 (resistente a ivermectina) de *C. elegans*. No existe diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) en el número de nematodos paralizados en cada una de ellas. En cuanto al comportamiento de reproducción, PG demostró tener un efecto inhibitorio significativo ( $p < 0.01$ ) de la puesta de huevos. Los extractos acuosos del resto de las plantas no mostraron un efecto inhibitorio significativo de la oviposición de *C. elegans* adultos. Todas las plantas utilizadas en este estudio, tienen la capacidad de disminuir la locomoción de los nematodos, sin embargo el efecto de parálisis es una característica que se espera de un antihelmíntico eficiente. PG tiene esta característica ya que además de paralizar significativamente a la población de *C. elegans* adultos de la cepa N2, lo hace con cepas resistentes (CB193 y DA1371). Asimismo tiene un efecto inhibitorio de la oviposición.

**Palabras clave:** resistencia, parálisis, oviposición, *Psidium guajava*.

## ABSTRACT

The high prevalence of resistance to antiparasitic drugs has emerged in nematodes of species of economic importance, (Sangster y Gill, 1999). The assessment of anthelmintic potential of plants, is one of the possible solution to being investigated as a solution to the problem of resistance to all types of broad-spectrum anthelmintic drugs widely used in veterinary and human medicine. In this work was assessed the anthelmintic potential of aqueous extracts of three cultivated plants (*Dysphania ambrosioides*, *Persea americana* and *Psidium guajava*) and one wild plant (*Marrubium vulgare*), using the nematode *C. elegans* with model. Was collected botanical material, which was treated to obtain aqueous extracts same as that used for locomotion behavior and reproduction bioassays of wild type and two mutant strains (CB193 y DA1371) of *C. elegans*. The response variables were: number of paralyzed nematodes, nematodes with atypical movement, trashing number and egg laying. The paralyzing effect that the extract of *Psidium guajava* (PG) on the N2 strain of *C. elegans* is more robust than the other plants used in this study. From 1 to 25 mg/ml paralysis of nematodes is significantly higher ( $p < 0.01$ ) than in negative control (M9). The rest of the plants evaluated in this study, produced atypically movement in the nematodes, however nematodes did not submit paralysis in the time set for the evaluation (8 hours). PG inhibits locomotion in N2, CB193 (resistant to levamisole) and DA1371 (resistant to ivermectin) strains of *C. elegans*. There is no significant difference ( $p > 0.05$ ) in the number of paralyzed nematodes in each. On the reproduction behavior, PG demonstrated a significant inhibitory effect ( $p < 0.01$ ) of the egg laying. Aqueous extracts of the other plants showed no significant inhibitory effect on oviposition. All plants used in this study, have the ability to decrease the locomotion of nematodes, but the effect of paralysis is a feature of an effective anthelmintic expected, therefore according to the results obtained in this work only PG has this feature. PG paralyzes wild type strain and strains resistant (CB193 and DA1371). Also has an inhibitory effect on egg laying.

Keywords: resistance, paralysis, egg laying, *Psidium guajava*

Al Universo, que cada día me ofrece todo lo que necesito.

## AGRADECIMIENTOS

A todas las personas involucradas en este trabajo de investigación, porque cada uno de ustedes brindó al proyecto su conocimiento, tiempo y la mejor disposición para trabajar en equipo, porque con cada una de sus ideas y comentarios se pudo hacer frente a los obstáculos que se fueron presentando y solo de esta manera se logró sacar adelante el proyecto. De manera particular agradezco:

Al Dr. Fausto Arellano Carbajal, por su apoyo, dedicación y esfuerzo constante, durante todo el proceso de este trabajo de investigación, así como por la calidez humana que me brindó durante mi estancia en el laboratorio de Genética Molecular y Ecología Evolutiva.

Al Dr. Luis Antonio Salazar Olivo, por la aportación de valiosas recomendaciones al proyecto. Además agradezco la hospitalidad brindada durante mis estancias en el laboratorio que él dirige.

A la Dra. Maricela Gómez Sánchez, por su aportación al proyecto en la búsqueda y colecta de las plantas utilizadas en este estudio, así como por las observaciones y correcciones al trabajo.

A la Dra. Karina A. Acevedo Whitehouse, por su asesoría en el análisis de datos, observaciones y correcciones al trabajo.

A Zyanya Mayoral Peña, por el compañerismo y calidez humana que demostró en todo momento.

A la Facultad de Ciencias Naturales, en particular a los laboratorios de Salud y Nutrición animal y Nutrición humana por la facilitación de equipo de laboratorio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca no. 448812 otorgada para la realización de mis estudios de posgrado (Maestría en Recursos Bióticos).

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>1. Introducción</b> .....	1
<b>2. Antecedentes</b> .....	2
<b>3. Justificación</b> .....	9
<b>4. Hipótesis</b> .....	9
<b>5. Objetivos</b> .....	10
5.1. General.....	10
5.2. Particulares.....	10
<b>6. Métodos</b> .....	10
6.1. Obtención del material Botánico.....	10
6.2. Organismo de estudio y mantenimiento.....	11
6.3. Preparación de extractos crudos.....	11
6.4. Bioensayos.....	11
6.5. Caracterización química de los extractos.....	14
6.6. Análisis estadístico.....	15
<b>7. Resultados</b> .....	15
<b>8. Discusión</b> .....	21
<b>9. Conclusiones</b> .....	25
<b>10. Bibliografía</b> .....	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efecto paralizante de extractos acuosos sobre <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	16
Figura 2. Movimiento atípico de <i>Caenorhabditis elegans</i> expuesto a 25 mg/ml de <i>Psidium guajava</i> .....	17
Figura 3. Movimiento atípico de <i>Caenorhabditis elegans</i> expuesto a 25 mg/ml de <i>Marrubium vulgare</i> y <i>Persea americana</i> . .....	18
Figura 4. Cuantificación de la locomoción de <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	18
Figura 5. Efecto paralizante de <i>Psidium guajava</i> a 25 mg/ml sobre la cepa silvestre y mutantes de <i>Caenorhabditis elegans</i> . .....	19
Figura 6. Efecto de los extractos acuosos sobre la oviposición de <i>C. elegans</i> . .....	20
Figura 7. Análisis cromatográfico del extracto de <i>Psidium guajava</i> . .....	21

## 1. INTRODUCCIÓN

Los nematodos parásitos tienen un impacto negativo sobre la salud de humanos, plantas, animales domésticos y ganado, lo cual se traduce en importantes pérdidas económicas. En humanos se estima que las infecciones por helmintos afectan a un tercio de la población mundial, focalizándose en países en desarrollo (Brooker, 2010). Debido a que infectan animales y cultivos de importancia económica, los helmintos afectan la producción de alimento. Por ejemplo, los nematodos parásitos de plantas son responsables de pérdidas globales estimadas en 157 billones de dólares anuales, y algo semejante ocurre para el ganado y aves de corral, donde la mayoría de los animales destinados para consumo están temporal o constantemente expuestos a nematodos parásitos, lo que ocasiona serias pérdidas económicas, particularmente donde se practica el pastoreo intensivo (Anthony *et al.*, 2007). Aunado a esta problemática, el control por parte de los antihelmínticos sintéticos de uso comercial no ha sido eficiente, ya que se ha reportado resistencia de nematodos que parasitan especies de importancia económica, hacia las principales familias de fármacos antiparasitarios de amplio espectro, (Papadopoulos *et al.*, 2012).

La resistencia puede ocurrir a varios niveles; por un lado pueden ocurrir cambios en el blanco molecular de modo que el fármaco no reconoce el objetivo y es por lo tanto ineficaz, o modificaciones del metabolismo que inactivan y/o elimina el fármaco, o deberse a un cambio en la distribución del fármaco en el objetivo, lo que impide que la droga acceda a su sitio de acción (Kaminsky *et al.*, 2008). A pesar de esto, nuevas clases de antihelmínticos no se han desarrollado, desde la aparición de ivermectina que tiene más de 25 años en el uso veterinario y más de 18 en el consumo humano, no se han introducido en el mercado nuevos antihelmínticos. Por tal razón es necesario desarrollar ensayos moleculares capaces de detectar nematodos resistentes, así como encontrar nuevos métodos para el control (Kaplan, 2004).

Una alternativa que se investiga como solución a la problemática de resistencia, es la búsqueda en plantas de metabolitos potencialmente antihelmínticos, este tipo de estudios están fuertemente respaldados por el conocimiento y prácticas tradicionales en el uso de las plantas (Geary, *et al.*, 2012). En algunos países en desarrollo, la etnofarmacología forma parte importante de su cultura y medicina preventiva, ya que existen zonas que carecen

de acceso a la medicina alópata para el cuidado de la salud. Por lo tanto existe interés científico en el estudio de las prácticas etnobotánicas, para el desarrollo y promoción de medicamentos eficaces, basados en los principios activos de plantas disponibles a nivel local (Martin *et al.*, 2001). En México, alrededor del 25% de la población (aproximadamente 28 millones de personas), depende todavía del uso de plantas medicinales para combatir enfermedades (Argueta y Cano, 1994). De manera particular, la medicina tradicional mexicana utiliza una gran variedad de plantas para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, como las diarreas infecciosas ocasionadas muchas veces por parásitos, una de las diez causas más importantes de muerte en las zonas rurales (INEGI, 1999). Aunque para países en desarrollo, la medicina tradicional es la primera alternativa en el cuidado de la salud (McGaw *et al.*, 2000), el potencial de muchas plantas no se ha ensayado experimentalmente y sus metabolitos activos, así como sus mecanismos de acción, son todavía desconocidos.

Es en este contexto, esta investigación buscó evaluar la capacidad antihelmíntica de algunas plantas reconocidas y registradas en el conocimiento tradicional. El nematodo *Caenorhabditis elegans*, se utilizó como modelo dadas sus ventajas de mantenimiento en el laboratorio, ya que tiene un tamaño pequeño, corto tiempo de generación, facilidad de mantenimiento e información genómica y neural disponible. Éste, es un modelo ideal para realizar bioensayos con un enfoque genético y molecular que podría permitir conocer el mecanismo de acción de los metabolitos activos de las plantas propuestas para el estudio (Jones *et al.*, 2005).

## 2. ANTECEDENTES

Los nematodos parásitos son los agentes causales de muchas enfermedades en humanos, animales y plantas. Se estima que más de dos mil millones de personas están infectados y las infecciones están vinculadas a condiciones de deterioro de la salud, como la anemia y la desnutrición, a pesar de que rara vez causan la muerte directamente (Anthony *et al.*, 2007). Infecciones en cultivos y animales destinados para consumo causan graves pérdidas económicas (Paterson *et al.*, 2007; Behnke *et al.*, 2008). Por tanto, es importante desarrollar antihelmínticos que sean eficaces y seguros de usar y que eviten o retrasen el desarrollo de

resistencia a los fármacos.

### 2.1. Uso de plantas con capacidad antihelmíntica

En muchos países en vías de desarrollo, los agricultores, ganaderos, pastores y algunos veterinarios utilizan productos vegetales para tratar los casos de parasitismo. Los métodos de preparación y uso de algunas de estas plantas, están documentados (Anon, 1996; Wanyama, 1997b). Por ejemplo, las semillas o el follaje de las plantas *Allium sativum* L., *Allium cepa* L., *Mentha piperita* L., *Carya illinoensis*, *Anethum graveolens* L. y *Petroselinum crispum* Miller, se utilizan para tratar animales que sufren de parasitismo gastrointestinal, mientras que las semillas de *Cucurbita máxima* y *Cucumis sativus*, se asocian con la expulsión de las tenias desde el tracto gastrointestinal (Guarrera, 1999). Sin embargo la eficacia antihelmíntica, así como el mecanismo de acción de la mayoría de estas plantas, no está científicamente validado y en muchos casos los componentes activos también se desconocen (Githiori *et al.*, 2003).

La evidencia de las propiedades antihelmínticas de extractos de plantas se deriva principalmente de fuentes etnoveterinarias. El uso de la plantas en preparaciones etnoveterinarias se documenta en diferentes partes del mundo (Watt y Breyer-Brandwijk, 1962; Bizimana, 1994; Wanyama, 1997a, b; Waller *et al.*, 2001). Plantas con propiedades antihelmínticas se incluyen en la Farmacopea Británica (British Veterinary Codex, a, b). Por ejemplo, en el Reino Unido, las hojas y flores secas de *Dysphania ambrosioides*, se utilizan como antihelmíntico desde principios de 1900 (Guarrera, 1999). *Dysphania* se utiliza para el tratamiento de infecciones por helmintos en América Latina. Asimismo, el helecho macho *Dryopteris filix-mas* y *Artemisia* spp, se han utilizado en los rumiantes contra cestodos *Moniezia* spp y en aves de corral contra nematodos tales como *Ascaridia* spp, (British Veterinary Codex, 1965). En los países en vías de desarrollo se tienen identificadas numerosas plantas que están destinadas y tienen el potencial para ser utilizadas como antihelmínticos. Sin embargo, la mayoría de los datos recogidos por fuentes etnoveterinarias es en forma de observaciones y no de estudios científicos formales (Hammond *et al.*, 1997).

### 2.1.1. Plantas identificadas por su acción antihelmíntica

La etnobotánica médica y etnofarmacología se han concentrado inicialmente en la recopilación de inventarios de etnofarmacopeas botánicas.

Actualmente, las farmacopeas locales de los países en vías de desarrollo incluyen tanto medicamentos a base de hierbas como productos farmacéuticos (Etkin *et al.*, 1990; Ngokwey, 1995; Waldstein, 2006). Sin embargo, para las plantas de uso etnofarmacológico, son pocos los estudios que plantean el modo de acción, identificando sus componentes químicos y cuantificando el potencial de los mismos.

#### 2.1.1.1. *Dysphania ambrosioides* L.

*Dysphania ambrosioides* (*Amaranthaceae*), es una planta anual con un fuerte olor aromático y alcanza una altura de 1 m



aproximadamente (Wirth, 1920; Cabanis *et al.*, 1970).

Conocida como “epazote” y “paico” en Mesoamérica y los Andes respectivamente, esta planta se ha usado como antihelmíntico durante siglos (Morton, 1980; Millspaugh, 1892), y a inicios del siglo XVIII fue adoptada por el resto del mundo (Kliks, 1985). En

Centroamérica la forma tradicional de preparar epazote es hacer una infusión de la planta seca. A principios del siglo XIX, *D. ambrosioides* se destiló para producir aceite, un potente antihelmíntico (Mc Donald *et al.*, 2004). Smillie y Pessoa (1924) mostraron por primera vez que las propiedades antihelmínticas del aceite de *Dysphania* se deben al Ascaridol, compuesto que constituye más de 50% del peso del aceite (Nelson, 1920; Paget, 1926; Johnson y Croteau, 1984). Aunque no se pudo encontrar ningún registro de envenenamiento o muerte surgidos de la ingestión de infusión de epazote, hubo numerosos informes de intoxicación como resultado de su ingesta de aceite de epazote (Levy, 1914). Las muertes principalmente por sobredosis, llevaron a la decadencia comercial de la utilización del aceite, a favor de los medicamentos más modernos. A esta planta se le atribuyen diversos usos etnofarmacológicos. Se reporta que las hojas y tallos tienen efectos cardiotónicos y antiespasmódicos, así como vermífugo contra áscaris y tenia (Boiteau,

1986). La planta también se utiliza para el tratamiento de la sífilis, sarampión (Cabanis *et al.*, 1970) y enfermedades intestinales (Noumi y Yomi, 2001). Los extractos de *D. ambrosioides* exhiben actividad molusquicida (Hmamouchi *et al.*, 2000) y se utilizan en el tratamiento de enfermedades pulmonares (Lall y Meyer, 1999). El aceite esencial de la planta posee propiedades antibacterianas y fungicidas (Begum *et al.*, 1993; Bourrel *et al.*, 1995.).

#### 2.1.1.2. *Marrubium vulgare* L.



*Marrubium vulgare* (Lamiaceae), conocido comúnmente como “marrubio”, es originaria de las regiones templadas de Europa, norte de África y Asia pero naturalizada y de amplia distribución en México (Argyropoulou, *et al.*, 2009). En la medicina tradicional mexicana el uso de *M. vulgare* se reconoce para tratar trastornos gastrointestinales específicamente dolor de estómago, diarrea y gastritis (Castillo *et al.*, 2009). Se reportó el efecto de un extracto metanólico, en la inhibición del crecimiento de epimastigotes del parásito intracelular *Trypanosoma cruzi*, 98.99% de inhibición después de 96 horas de exposición al extracto (Molina G. *et al.*, 2014). Para *M. vulgare* se han reportado diversos usos etnofarmacológicos alrededor del mundo. En el norte de África las plantas de *Marrubium vulgare* se utilizan en la medicina popular como expectorantes y por sus propiedades antiespasmódicas en la bronquitis aguda o crónica, tos, el asma y en general para las infecciones respiratorias, también se utilizan en los casos de falta de apetito y dispepsia. Particularmente *M. vulgare* (“marrubio blanco” o “marrubio común”), actualmente es utilizada por los curanderos tradicionales, sola o combinada con otras hierbas como *Inula helenium* L. (“helenio”) y *Glycyrrhiza glabra* L. (“regaliz”), para el tratamiento de la bronquitis, tos y los resfriados. Las hojas y tallos jóvenes en floración se utilizan como antisépticos, antiespasmódicos, antidiabéticos, diuréticos y expectorantes (Delile, 2007). Además se le atribuye capacidad antioxidante (Berrougui, *et al.*, 2006), analgésica (Meyre-Silva, *et al.*, 2005), antiinflamatoria (Sahpaz, *et al.*, 2000), asimismo los

extractos de esta planta han demostrado algunos efectos en la diabetes tipo II (Herrera-Arellano, *et al.*, 2004) y en trastornos neurológicos (Erdogan, *et al.*, 2010). Extractos procedentes de *Marrubium vulgare*, han mostrado un patrón metabólico complejo. Conteniendo metabolitos secundarios tales como diterpenos (Rodrigues, 1998, Citoglu y Aksit, 2002), flavonoides (Nawwar, *et al.*, 1989) y ésteres propanoides fenilo junto con sus derivados (Sahpaz, *et al.*, 2002; Papoutis, *et al.*, 2006). En particular, el diterpeno lactona marrubina, se considera como un marcador para esta especie taxonómica, ya que su aparición es prácticamente omnipresente a lo largo de las diferentes variedades de plantas. La marrubina también se considera la molécula responsable de la mayoría de las propiedades biológicas atribuidas al género *Marrubium*, particularmente a *M. vulgare*. La apigenina y luteolina son los flavonoides más comunes presentes en las especies, que es una característica peculiar de la familia *Lamiaceae* (Nawwar, *et al.*, 1989).

#### 2.1.1.3. *Persea americana* Miller



*Persea americana* (*Lauraceae*), conocida como “palta o aguacate”, es un árbol de hoja perenne, de aproximadamente 20 m de altura que se originó en América Central, pero ahora se encuentra en la mayoría de los países tropicales y subtropicales. La corteza, frutos y hojas se utilizan en medicina tradicional en América del Sur y Central, Antillas y África para el tratamiento de diversas enfermedades como: hipertensión (Gupta *et al.*, 1979), menorragia (Watt *et al.*, 1962), dolor de estómago, bronquitis (Giron *et al.*, 1991), diarrea y diabetes (Ramírez *et al.*, 1998). Por sus efectos analgésicos y antiinflamatorios, las hojas son usadas para tratar esguinces y fracturas, lo cual se demostró en un estudio in vivo (Adeyemi *et al.*, 2002). Los compuestos presentes en el aguacate previenen la inhibición de la producción de osteoblastos y condrocitos en osteoartritis y fue sugerido que sus componentes activos podrían promover la reparación del cartílago (Henrotin *et al.*, 2006). El uso etnofarmacológico de *P. americana* en desordenes gastrointestinales ha sido documentado para tratar específicamente diarrea, parásitos y dolor de estómago (Castillo *et al.*, 2009). Se han realizado estudios in vivo e in vitro para confirmar las propiedades que se le atribuyen

a la planta. En un estudio in vivo se demostró que una mezcla insaponificable de frijol de soya y *Persea americana* (300 mg/Kg), eliminó 98.1% de gusanos (*Schistosoma mansoni*) en ratones infectados (Soliman, 2012). Asimismo en estudios in vitro se ha reportado moderada actividad trypanocidal de la semilla de *P. americana* contra epimastigotes de *T. cruzi* (Abe *et al.*, 2005).

#### 2.1.1.4. *Psidium guajava* L.



*Psidium guajava* (Myrtaceae), conocido con “guayabo”, es un árbol que alcanza aproximadamente 10 m de alto, de corteza irregular y exfoliante, sus hojas son opuestas; de peciolo corto, con prominentes venas pinadas y de 5 a 15 cm de largo. Las flores poseen pétalos blanquecinos de hasta 2 cm de longitud y numerosos estambres (Stone, 1970). Los

frutos son carnosos, de forma globosa a ovoide, de color amarillo, baya de unos 5 cm de diámetro con un mesocarpio comestible de color rosa, con numerosas y pequeñas semillas blancas y duras. Estudios etnofarmacológicos muestran que *Psidium guajava*, se usa en muchas partes del mundo, para el tratamiento de enfermedades como la diabetes, hipertensión, caries, llagas, alivio de dolor antiinflamatorio y reducción de la fiebre. Países de América como México, tienen una larga historia del uso medicinal tradicional de la guayaba, asimismo países del Caribe, África y Asia. Algunos de los usos en estos países son para tratar trastornos gastrointestinales y respiratorios, asimismo se utiliza como un medicamento antiinflamatorio (Aguilar *et al.*, 1994). Comúnmente las raíces, cortezas, hojas y frutos inmaduros, se utilizan en el tratamiento de la gastroenteritis, diarrea y disentería. Las hojas se aplican en úlceras y para mitigar los dolores reumáticos, si se mastican alivian el dolor de muelas (Heinrich *et al.*, 1998). Un extracto acuoso de la hoja, se utiliza para reducir el nivel de glucosa en sangre. La hoja de *Psidium guajava* se utiliza en la medicina tradicional africana para controlar y/o tratar la diabetes mellitus y la hipertensión (Ojewole, 2005; Oh *et al.*, 2005). En la medicina tradicional de América Latina y el Caribe se utiliza ampliamente para el tratamiento de diarrea y dolores de

estómago debido a la indigestión, gastroenteritis y disentería. (Mejía y Rengifo, 2000; Mitchell y Ahmad, 2006 a, b).

## 2.2. Uso de *C. elegans* como modelo en ensayos sobre actividad antihelmíntica

El nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* es el organismo que más se conoce a nivel molecular. *C. elegans* ha sido estudiado en muchos aspectos de la biología de los animales, incluyendo desarrollo y comportamiento. Este nematodo se ha considerado como modelo desde 1960, cuando investigadores buscaron un organismo multicelular con pocas células, fácil de cultivar y reproducir. Información genómica y neural disponible en este organismo, ha permitido la aplicación de potentes enfoques genéticos moleculares para entender el modo de acción de drogas antihelmínticas, así como los mecanismos de resistencia hacia estas (Geary y Thompson, 2001). Debido a que *C. elegans* comparte características fisiológicas y anatómicas con otros nematodos parásitos, tiene el potencial de ser la herramienta idónea, en estudios para el descubrimiento de nuevos antihelmínticos (Jones *et al.*, 2005). La citoarquitectura general del sistema nervioso se conserva entre *C. elegans* y *A. suum*, lo que sugiere de acuerdo a la distancia filogenética entre estas especies, que esta conservación debe considerarse típica de los nematodos en general. Estas similitudes son de particular importancia debido a que la mayoría de los antihelmínticos impactan la neuromusculatura (Stretton *et al.*, 1991; Davis y Stretton, 1996). Asimismo, basándose en análisis genéticos, se determinó que más del 40% de los genes de nematodos parásitos son homólogos a genes de *C. elegans* y que este nematodo pertenece al orden Rhabditida, el cual está estrechamente asociado con el orden Strongylida al que pertenecen parásitos importantes de los rumiantes, incluyendo *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus* spp (Mitreva *et al.*, 1995). Por lo tanto se considera que *C. elegans* es un organismo modelo válido para el descubrimiento de antihelmínticos de amplio espectro. Puesto que un producto útil tendrá actividad contra nematodos situados en todos los clados (Geary y Thompson, 2001).

Además de las similitudes que presenta *C. elegans* con nematodos parásitos, cumple con los criterios necesarios para ensayos *in vitro*, ya que se encuentra disponible, su mantenimiento es barato y experimentalmente es fácil de manejar. Además se puede

mantener en cultivos continuos debido a que su ciclo de vida es menos complejo comparado con nematodos parásitos, lo que permite realizar un mayor número de ensayos y trabajar con nematodos adultos (etapa infectiva de muchos nematodos) que son el mayor blanco (McGaw *et al.*, 2007; Katiki *et al.*, 2011). De esta forma con *C. elegans*, se puede evaluar *in vitro* el mecanismo de acción de compuestos con actividad antihelmíntica a través de su efecto en la reproducción, (realizando ensayos de eclosión de huevos) y de motilidad larval. En contraste con estudios *in vivo*, en los cuales para probar un extracto o compuesto potencialmente antihelmíntico, se utiliza al rumiante como modelo, lo cual requiere infraestructura y grandes cantidades de material vegetal, por lo tanto se considera poco factible (Hoste *et al.*, 2006; Eguale *et al.*, 2007; Brunet *et al.*, 2008). (Katiki *et al.*, 2011).

### 3. JUSTIFICACIÓN

En países en desarrollo, la alta prevalencia de infecciones por helmintos, así como la resistencia desarrollada por nematodos hacia las principales familias de fármacos disponibles, plantean la necesidad del desarrollo de nuevos antihelmínticos. Un primer paso es la búsqueda de compuestos antihelmínticos en fuentes naturales con base en el uso y conocimiento tradicional. Estudios científicos que evalúen el potencial antihelmíntico de tales compuestos nos proporcionaría las herramientas para el tratamiento de ese importante problema de salud.

### 4. HIPÓTESIS

Los extractos acuosos de plantas tradicionalmente consideradas como antihelmínticas, contienen compuestos con efectos antihelmínticos medibles sobre la locomoción y fertilidad del nematodo modelo *C. elegans*.

### 5. OBJETIVOS

#### 5.1. General

Determinar el potencial antihelmíntico de extractos acuosos de las plantas *Dysphania ambrosioides* (DA), *Marrubio vulgare* (MV), *Persea americana* (PA) y *Psidium guajava*

(PG) evaluando sus efectos sobre la locomoción y oviposición del nematodo modelo *C. elegans*.

## 5.2. Particulares

- Determinar si los extractos de DA, MV, PA y PG afectan la locomoción de *C. elegans*, con base a la disminución en el movimiento de los nematodos.
- Determinar si los extractos de DA, MV, PA y PG afectan la reproducción de *C. elegans*, con base en la tasa de oviposición.
- Evaluar el efecto de los extractos botánicos (DA, MV, PA y PG), sobre las cepas de *C. elegans* CB193 resistente a levamisol y DA1371 resistente a ivermectina.
- Identificar las familias de compuestos químicos presentes en los extractos.

## 6. MÉTODOS

### 6.1. Obtención del material botánico

Ejemplares de las plantas *Dysphania ambrosioides* (DA), *Marrubio vulgare* (MV), *Persea americana* (PA) y *Psidium guajava* (PG), que la tradición etnobotánica o que el conocimiento tradicional reputa como antihelmínticas, se recolectaron en localidades seleccionadas de acuerdo a sus patrones de distribución natural, así como de zonas productoras del Bajío y Occidente de México y su identidad taxonómica fue confirmada. Ejemplares de resguardo se mantienen en la colección del Herbario (QMEX) de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ. El material botánico se separó en las distintas partes aéreas de las planta, de MV y DA se tomaron hojas y flores juntas (hf) y tallo (t) por separado, de PG y PA se usaron las hojas. Las partes seleccionadas se secaron al aire al abrigo de la luz y se preservaron en bolsas plásticas hasta su utilización.

## 6.2. Organismo de estudio y mantenimiento

La cepas utilizadas provienen del Caenorhabditis Genetics Center (CGC). La cepa silvestre N2 y las cepas mutantes de *C. elegans* CB193 y DA1371 se cultivaron en placas con medio de crecimiento para nematodos (NGM) (Brenner, 1974). La composición del medio NGM para preparar 500 ml antes de someter a la autoclave fue de: 1.5 g de NaCl, 10 g de agar bacteriológico, 1.25 g de peptona, y agua destilada. Después del autoclavado se complementó con las soluciones: 0.5 ml de CaCl<sub>2</sub> 1M, 0.5 ml MgSO<sub>4</sub> 1M, 0.5 ml de colesterol (5 mg de colesterol por 1,0 ml de etanol al 95%) y 12.5 ml de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Sobre el medio de cultivo se hizo crecer un césped bacteriano de *Escherichia coli* OP50 como fuente de alimento para los nematodos.

## 6.3. Preparación de Extractos crudos

20 g del material botánico seco y pulverizado de cada planta se sometió a decocción en 250 ml de agua bidestilada por 2 horas con agitación constante. La decocción se filtró con una malla de tela y se precipitó a 10,000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se filtró a través de membranas con poros de 45 µm y finalmente el filtrado se liofilizó y se almacenó en tubos estériles a temperatura ambiente y en ausencia de luz hasta su utilización en los bioensayos sobre *C. elegans*.

## 6.4. Bioensayos

Para probar la bioactividad de los extractos se evaluó la locomoción y reproducción de *C. elegans* expuestos a 25 mg/ml de extractos acuosos de las plantas seleccionadas. De los resultados a 25 mg/ml se seleccionó *Psidium guajava* (PG) por ser la planta que demostró un efecto antihelmíntico sobresaliente y con el extracto de ésta se probaron concentraciones menores (1, 5 y 10 mg/ml). Levamisol (Sigma) se utilizó como control positivo a una concentración de 400 µM y Buffer M9 (5mM KPO<sub>4</sub> [pH6], 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>) como control negativo (Emmons, 1997).

### 6.3.1. Bioensayos de locomoción

Para este ensayo se utilizó la cepa silvestre de *C. elegans* N2. Los gusanos fueron cultivados con medio NGM, en placas de nueve centímetros (Brenner, 1974) con bacteria *E. coli* OP50 como fuente de alimento. Para exponer los gusanos al extracto se utilizó una placa con veinticuatro pozos, en ella se colocaron diez nematodos adultos por pozo, tomados de placas donde había poblaciones sincronizadas de *C. elegans*, el pozo con 250  $\mu$ l de Buffer M9. De la misma forma se colocaron diez nematodos adultos para el control positivo y diez para el control negativo. Una vez transferidos los adultos de los tres pozos, se aplicó a uno de los pozos 250  $\mu$ l del extracto acuoso de alguna de las plantas utilizadas en este estudio (DA, MV, PA y PG) completando un volumen de 500  $\mu$ l a la concentración determinada para el ensayo (25 mg/ml), a su vez a uno de los pozos restantes se aplicó 250  $\mu$ l de Levamisol Sigma para completar 500  $\mu$ l a una concentración de 400 $\mu$ M y al pozo restante se adicionó 250  $\mu$ l de M9 para completar el volumen del control negativo.

la habilidad de movimiento de los diez nematodos se evaluó categorizando el tipo de movimiento como sigue:

- 1) Movimiento sinusoidal: recíproca contracción y relajación de los músculos dorsales y el cuerpo de pared ventral, produciendo un movimiento ondulante que se extiende a lo largo de la longitud del cuerpo del gusano, generando una curva corporal que lo impulsa hacia adelante o hacia atrás.
- 2) Movimiento atípico: cualquier tipo de movimiento diferente al sinusoidal.
- 3) Paralizado: se presenta cuando no existe ningún tipo de movimiento de cabeza, cola o faringe durante 10 segundos de observación.

El número de gusanos en cada categoría se cuantificó y las evaluaciones se hicieron durante ocho horas (tiempo que permite evaluar de forma detallada la evolución del efecto de los extractos sobre el nematodo modelo), los primeros minutos de cada hora se realizó el recuento. Ensayos para cuantificar la habilidad de movimiento de los nematodos se hicieron considerando el número de curvas corporales (coleteos) producidas por el gusano en un minuto. De todos los ensayos se realizaron doce réplicas, de acuerdo a resultados obtenidos para calcular tamaño de muestra con datos preliminares.

Ensayos similares se realizaron con concentraciones del extracto menores a 25 mg/ml con las plantas que presentaron una actividad antihelmíntica sobresaliente a esta concentración.

### 6.3.2. Bioensayos de locomoción en mutantes de *C. elegans*

Para este ensayo se utilizó la cepa silvestre de *C. elegans* N2, la cepa CB193 resistente a levamisol y la cepa DA1371 resistente a ivermectina. Los nematodos de cada cepa se cultivaron en placas de nueve centímetros con medio NGM (Brenner, 1974) con la bacteria *E. coli* OP50 como fuente de alimento. Para este ensayo se utilizó el extracto acuoso de *Psidium guajava* (PG), dado su efecto contundente en la disminución de la locomoción frente a la cepa silvestre N2 de *C. elegans*.

Para exponer los gusanos al extracto se utilizó una placa con veinticuatro pozos, en la cual se colocaron en un pozo, diez gusanos adultos tomados de placas donde había poblaciones sincronizadas de *C. elegans* N2, con 250 µl de Buffer M9. Diez gusanos adultos de la cepa CB193 se colocaron en un segundo pozo y diez nematodos adultos de la cepa DA1371 en un tercero, los dos últimos bajo las mismas condiciones que el primero. Una vez transferidos los gusanos adultos de las tres cepas, se aplicó a cada uno de los pozos 250 µl del extracto acuoso de PG, completando un volumen de 500 µl a una concentración de 25 mg/ml. El comportamiento de los diez nematodos se evaluó categorizando de la siguiente forma:

- 1) presenta movimiento: los nematodos exhiben cualquier tipo de movimiento.
- 2) Paralizado: se presenta cuando no existe ningún tipo de movimiento de cabeza, cola o faringe durante 10 segundos de observación.

El número de gusanos en cada categoría se cuantificó y las evaluaciones se hicieron durante seis horas (tiempo establecido en el cual se observa un efecto de completa parálisis en todos los nematodos de la cepa N2 de *C. elegans* a 25 mg/ml del extracto acuoso de PG), a los primeros minutos de cada hora se hizo el recuento. Se realizaron doce réplicas de acuerdo a resultados obtenidos para calcular tamaño de muestra con datos preliminares.

### 6.3.3. Bioensayos de reproducción

Se midió el efecto de los extractos acuosos sobre la puesta de huevos en la cepa silvestre de *C. elegans* N2. Los nematodos se cultivaron en placas de nueve centímetros con medio NGM (Brenner, 1974) con la bacteria *E. coli* OP50 como fuente de alimento. De poblaciones sincronizadas de *C. elegans* las cuáles se mantuvieron a 18° centígrados, se tomaron diez adultos hermafroditas grávidos y se expusieron durante una a dos horas (el tiempo de exposición es dependiente del efecto de parálisis de los extractos en los nematodos) a 25 mg/ml del extracto acuoso de las plantas utilizadas en este estudio (DA, MV, PA y PG). La exposición se realizó en medio acuoso. Transcurrido el tiempo se practicaron dos lavados, para eliminar el extracto, con 100 µl de Buffer M9, posteriormente se colocaron los gusanos en una placa de seis centímetros con medio NGM y la bacteria *E. coli* como fuente de alimento, donde se mantuvieron por un periodo de dos horas, transcurrido este tiempo la placa se lavó con Buffer M9 para extraer los nematodos. Finalmente se cuantificó la oviposición. Un control negativo se ensayó bajo las mismas condiciones, en este caso los nematodos estuvieron solo en contacto con Buffer M9. Los bioensayos se llevaron a cabo para cada extracto replicando cinco veces.

### 6.5. Caracterización química de los extractos

Se analizó una muestra seca de extracto acuoso mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), en un cromatógrafo Agilent 1200 (Palo Alto, CA, USA) sobre una columna analítica Synergi 4 mm Hydro-RP C18 80 Å (250 mm 4.6 mm, Phenomenex). La fase móvil fue acetonitrilo/agua, con un gradiente de elución de 40% acetonitrilo entre los 0 y 15 min y 95% de acetonitrilo a partir del minuto 15, con un flujo de 0.80 ml/min.

### 6.6. Análisis estadístico

Para los ensayos de locomoción, se compararon los valores del extracto con los controles positivo y negativo por cada tiempo en cada concentración. La significación estadística se determinó utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con un nivel de significancia menor a 0.05. Para los ensayos de reproducción, la significación estadística se

determinó utilizando la prueba t de Student (el nivel de significación de  $P < 0.05$ ). Los análisis estadísticos fueron determinados con el programa R (versión 3.1.0).

## 7.0. RESULTADOS

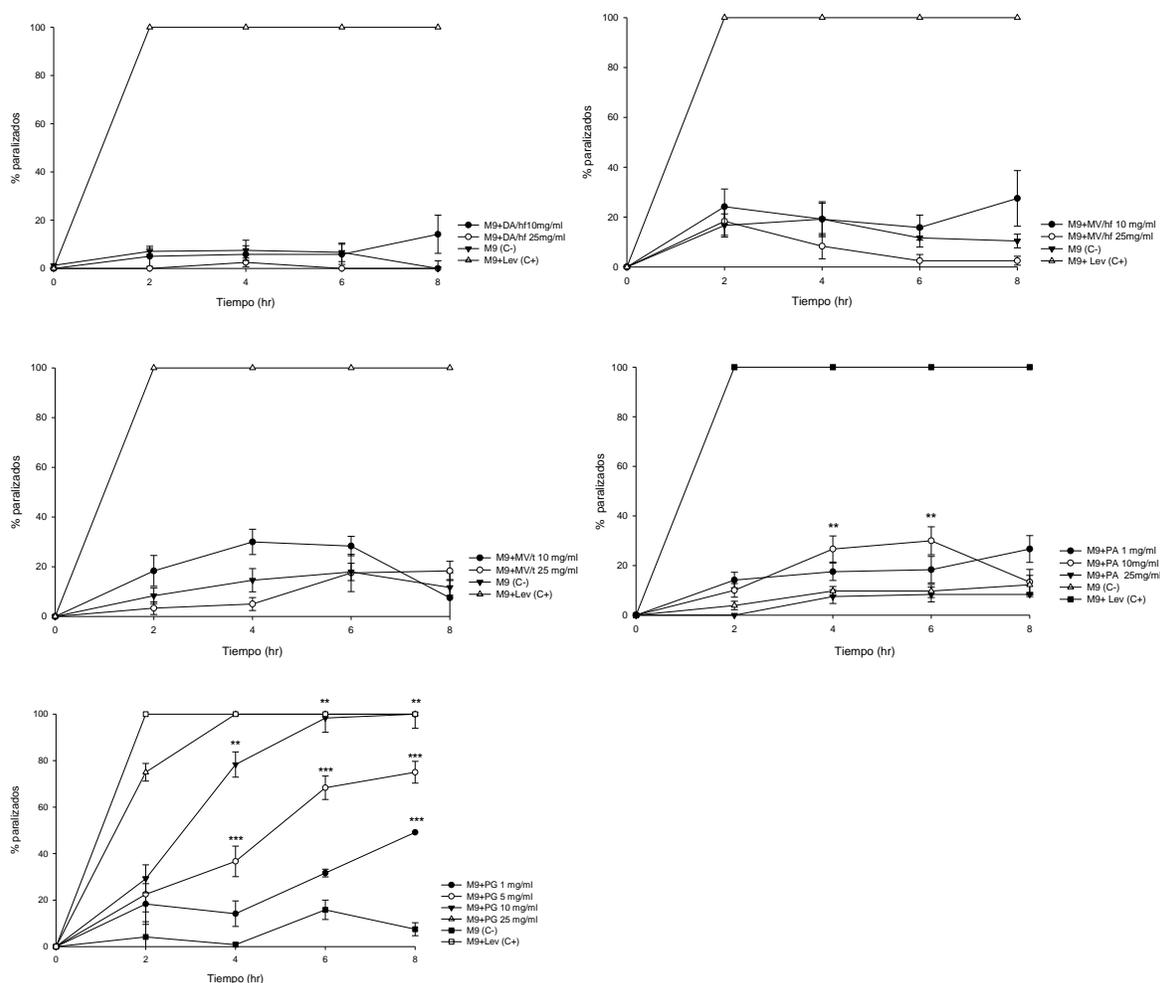
### 7.1. Efecto de los extractos sobre la motilidad de *C. elegans*

La motilidad permite a los nematodos realizar funciones vitales como desplazarse en busca de alimento, defenderse de sus depredadores y está estrechamente relacionada con la oviposición. Evaluar motilidad es una herramienta simple, sensible y de gran alcance, que permite al investigador evidenciar alteraciones a nivel funcional, ocasionadas por un estímulo externo (en este caso los extractos vegetales), que alteran la actividad basal del nematodo.

La locomoción se evaluó identificando el tipo de movimiento que realizan los nematodos y cuantificando el número de curvas corporales que realizan los mismos, definidas como número de coleteros por minuto. El efecto de parálisis del extracto de *Psidium guajava* (PG), sobre la cepa N2 de *C. elegans*, es sobresaliente en contraste con las demás plantas evaluadas.

A partir de la segunda hora de exposición a 25 mg/ml de PG, 75% de los nematodos se encontraron paralizados. Sin embargo hay una parálisis en el 100% de la población desde la cuarta hora de exposición manteniéndose hasta la octava hora. En todos los tiempos de exposición, la parálisis de los nematodos expuestos a PG es significativamente mayor ( $p < 0.01$ ) que en el control negativo (M9). La parálisis que ejerce PG sobre los nematodos es dosis dependiente. Después de ocho horas de exposición a PG a una concentración de 1 mg/ml, el 50% de la población se encuentra paralizada, con 5 mg/ml hay una parálisis del 75% de los nematodos. El número de nematodos paralizados es significativamente mayor ( $p < 0.001$ ) que el control negativo (M9) en ambos casos. A 10 mg/ml a partir de la cuarta hora de exposición, 78% de la población está paralizada, este número aumenta través del tiempo.

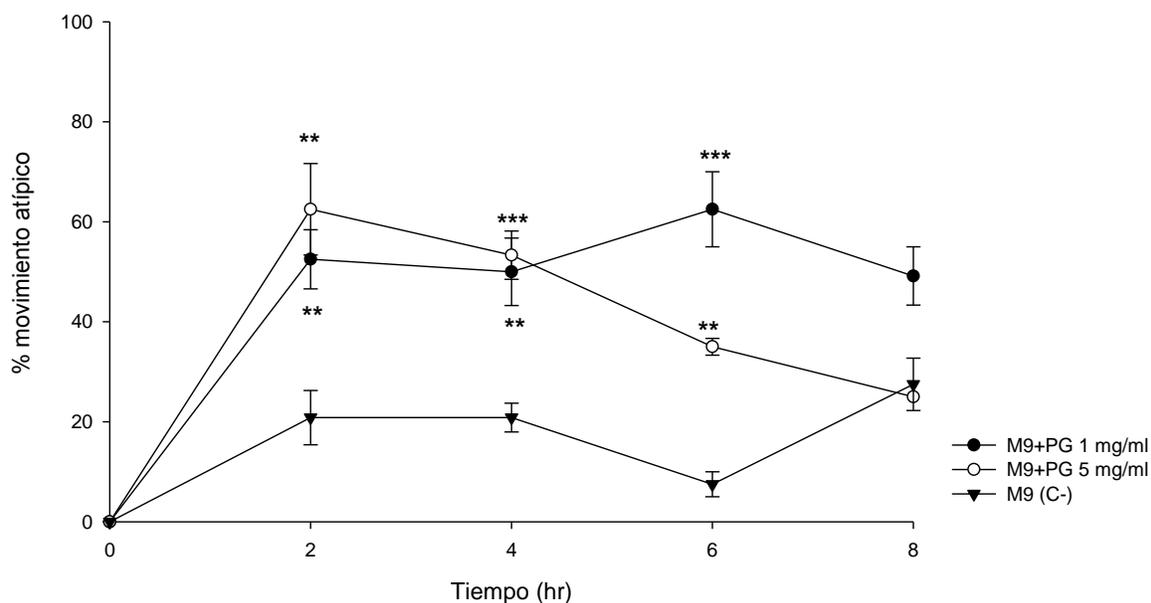
A la sexta hora casi el total de los nematodos se encuentran paralizados (98.3%), a partir de este punto no hay diferencia significativa entre el control positivo (Levamisol) y el extracto. El efecto de parálisis es contundente (Figura 1E).



**Figura 1. Efecto paralizante de extractos acuosos sobre *Caenorhabditis elegans*.** Adultos de la cepa silvestre N2 de *C. elegans* se incubaron en solución M9, M9 con las concentraciones indicadas de extractos acuosos de hojas y flores (DA/hf; A) de *Dysphania ambrosioides*, hojas y flores (MV/hf; B) o tallos (MVt; C) de *Marrubium vulgare*, hojas de *Persea americana* (PA; D), de *Psidium guajava* (PG; E) y M9 con Levamisol 400  $\mu$ M, en tratamientos con doce réplicas. En los tiempos señalados se registró el porcentaje de nematodos paralizados en cada tratamiento. Los resultados se compararon usando la prueba de Kruskal-Wallis, \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ ;  $n=10$ .

La parálisis es el efecto de mayor importancia que se desea observar al evaluar un extracto potencialmente antihelmíntico. Sin embargo se espera que la locomoción disminuya gradualmente a dosis menores. En el caso de los nematodos expuestos a 1 y 5 mg/ml de PG, en las primeras horas de exposición, los nematodos presentan un movimiento diferente al sinusoidal, considerado como movimiento atípico. Este tipo de movimiento en las

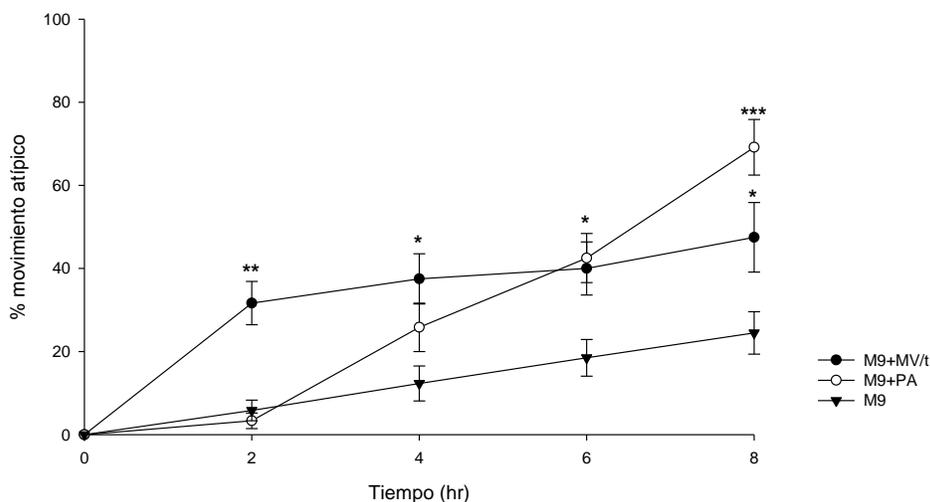
primeras horas de exposición se presenta en la mayor parte de la población (>50% y >60% respectivamente), sin embargo en ambos tratamientos (1 y 5 mg/ml), disminuye al finalizar el tiempo de exposición, debido al aumento de parálisis (Figura 2).



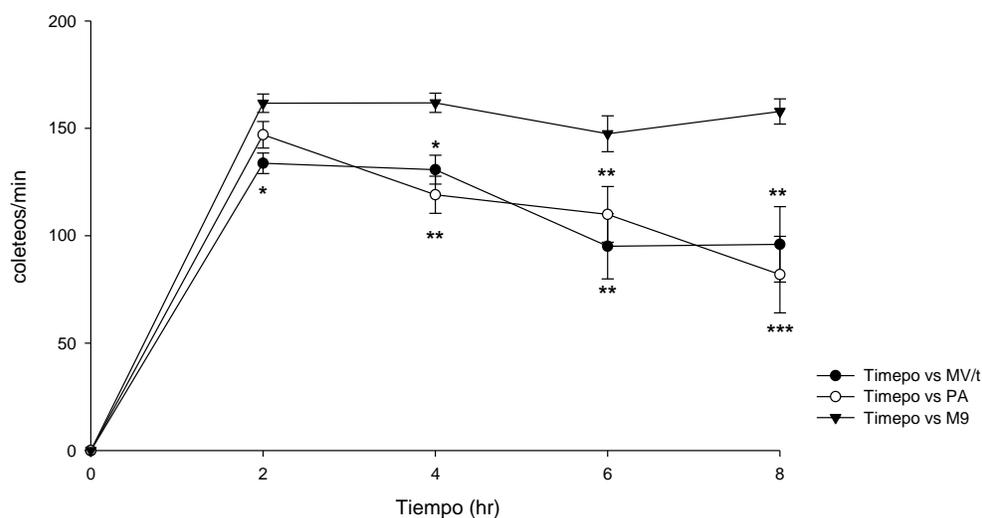
**Figura 2. Movimiento atípico de *Caenorhabditis elegans*.** Adultos de la cepa silvestre N2 de *C. elegans* se incubaron en solución M9, M9 con las concentraciones indicadas de extracto acuoso de *Psidium guajava* (PG), en doce réplicas. En los tiempos señalados se registró el porcentaje de nematodos que presentaron movimiento atípico en cada tratamiento. Los resultados se compararon usando la prueba de Kruskal-Wallis, \*\*\*P< 0.001; \*\*P< 0.01; \*P< 0.05; n=10.

Asimismo, el resto de las plantas (DA, MV y PA) a 25 mg/ml, ocasionan un movimiento atípico que se traduce en la disminución gradual de la motilidad de los nematodos, que ocurre a través del tiempo, sin embargo los nematodos no alcanzan la parálisis en el tiempo establecido para la evaluación (8 horas). Expuestos a extracto acuoso de *Persea americana* (PA) más del 50% de los nematodos se mueven atípicamente en la octava hora de exposición. El extracto acuoso de tallo de *Marrubio vulgare* (MV/t), desde la segunda hora afecta el movimiento de más del 30% de los nematodos manteniendo su actividad hasta la octava hora.

El movimiento atípico es significativamente mayor comparando con el control negativo (M9) en los casos mencionados (Figura 3).



**Figura 3. Movimiento atípico de *Caenorhabditis elegans*.** Adultos de la cepa silvestre N2 de *C. elegans* se incubaron en solución M9, M9 con 25 mg/ml de extracto acuoso de hojas y flores de *Marrubium vulgare* (MV/hf) y *Persea americana* (PA), en tratamientos con doce réplicas. En los tiempos señalados se registró el porcentaje de nematodos que presentaron movimiento atípico en cada tratamiento. Los resultados se compararon usando la prueba de Kruskal-Wallis, \*\*\*P< 0.001; \*\*P< 0.01; \*P< 0.05; n=10.



**Figura 4. Cuantificación de la locomoción de *Caenorhabditis elegans*.** Adultos de la cepa silvestre N2 de *C. elegans* se incubaron en solución M9, M9 con 25 mg/ml de extracto acuoso de hojas y flores de *Marrubium vulgare* (MV/hf) y *Persea americana* (PA), en tratamientos con doce réplicas. En los tiempos señalados se cuantificó el número de curvas corporales (coleteos/min) en cada tratamiento. Los resultados se compararon usando la prueba de Kruskal-Wallis, \*\*\*P< 0.001; \*\*P< 0.01; \*P< 0.05; n=10.

El efecto gradual de disminución de la locomoción por parte de PA y MV/t se confirmó, ya que el número de curvas corporales (coleteos/min) de los nematodos expuestos a estas plantas, es significativamente menor en contraste con el control (Figura 4).

Dada la parálisis que PG ejerce sobre la cepa silvestre de *C. elegans*, se probó el efecto sobre las cepas CB193, resistente a Levamisol y DA1371, resistente a ivermectina del nematodo *C. elegans*. La inhibición de la locomoción que produce PG en las cepas N2, CB193 y DA1371 de *C. elegans*, es semejante. No existe diferencia significativa ( $p>0.05$ ) en el número de nematodos paralizados en cada una de ellas. A partir de la cuarta hora de exposición a 10mg/ml del extracto, la mayoría de los nematodos de las tres cepas se encuentran paralizados (90.25% de la población de nematodos en N2, 87.5% en CB193 y 85.33% en DA1371) (Figura 5a). Con 20 mg/ml del extracto, la parálisis de los nematodos es contundente desde la segunda hora de exposición, 84.16% de la población de nematodos en N2 se encuentran paralizados, 90.83% en CB193 y 75% en DA1371 (Figura 5b). La inhibición de la motilidad en las tres cepas es dosis dependiente.

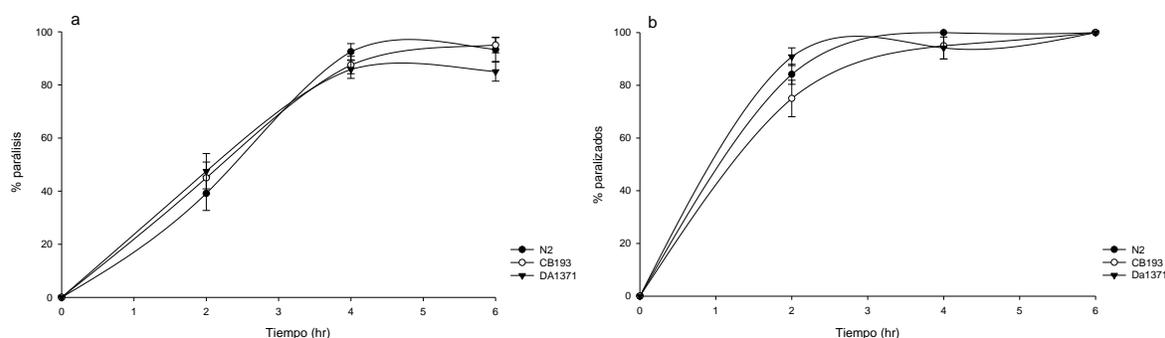


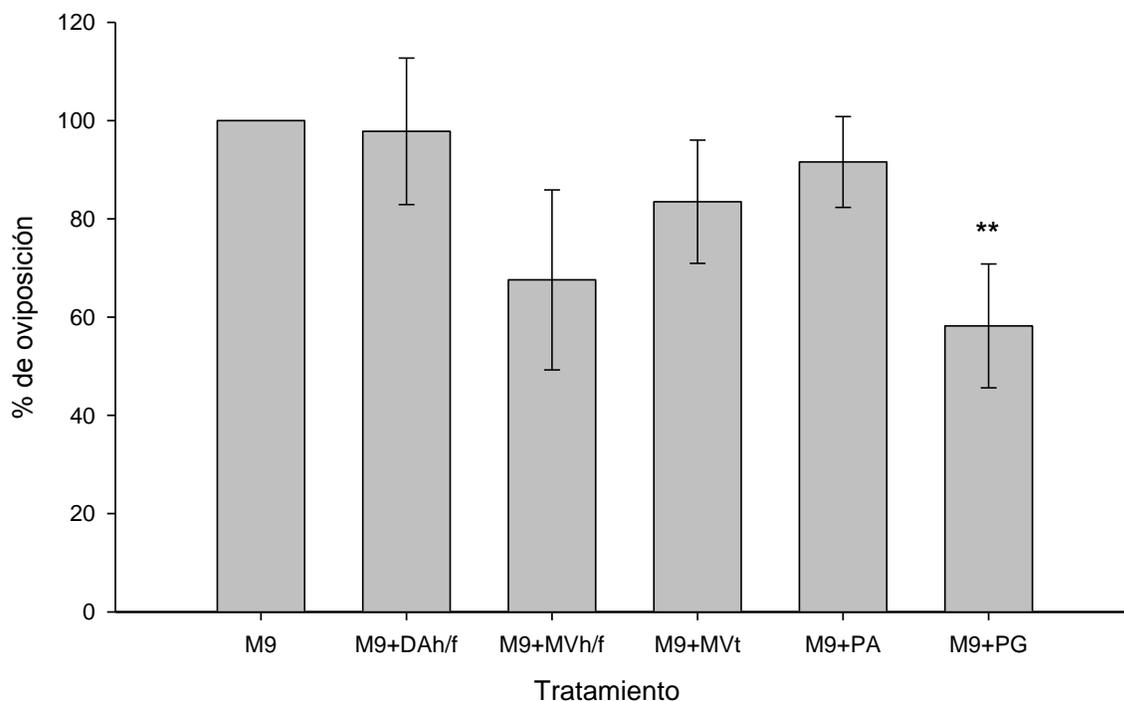
Figura 5. Efecto paralizante de *Psidium guajava* (PG) a 25 mg/ml sobre *Caenorhabditis elegans*. Adultos de la cepa silvestre N2 y las cepas mutantes CB193 y DA1371 de *C. elegans*, se incubaron con 25 mg/ml de PG, en tratamientos con doce réplicas. En los tiempos señalados se registró el porcentaje de nematodos paralizados de cada cepa. Los resultados se compararon usando la prueba de Kruskal-Wallis, \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ ;  $n=10$ .

## 7.2. Efecto de los extractos sobre la oviposición de *C. elegans*

La reproducción de *C. elegans* (N2), se evaluó a través del comportamiento de puesta de huevos. Nematodos hermafroditas grávidos, fueron expuestos dos horas a 25 mg/ml de los extractos de DA, MV, PA y una hora al extracto de PG (tiempo en el cual los nematodos aún presentan movimiento).

Se cuantificó la oviposición de *C. elegans* adultos. PG demostró tener un efecto inhibitorio significativo ( $p < 0.01$ ) de la puesta de huevos, es probable que los componentes activos de

esta planta, impacten la musculatura que permite abrir la vulva permitiendo que los huevos sean expulsados.



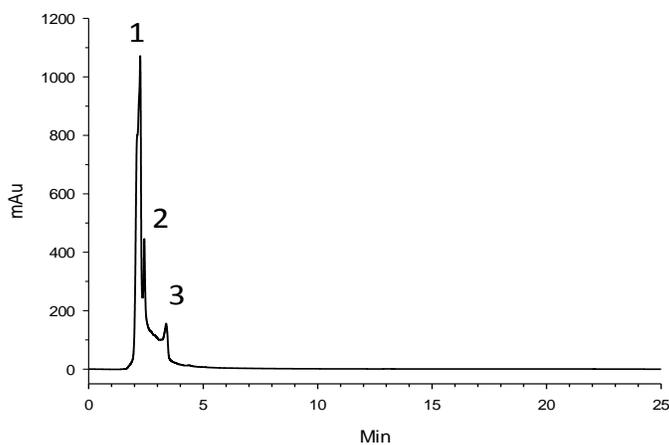
**Figura 6. Efecto de los extractos acuosos sobre la oviposición de *C. elegans*.** Adultos de la cepa silvestre N2 de *C. elegans* se incubaron en solución M9, M9 con 25 mg/ml de los extractos acuosos de hojas y flores (DA/hf) de *Dysphania ambrosioides*, hojas y flores (MV/hf) o tallos (MVt) de *Marrubium vulgare*, hojas de *Persea americana* (PA), de *Psidium guajava* (PG), en tratamientos con 12 réplicas. Se registró el porcentaje de oviposición en cada tratamiento. Los resultados se compararon usando la prueba t de Student, \*\*\*P<0.001; \*\*P<0.01; \*P<0.05; n=10.

Los extractos acuosos del resto de las plantas no mostraron un efecto inhibitorio significativo de la oviposición de *C. elegans* adultos, probablemente el tiempo de exposición fue muy corto para afectar de alguna manera los mecanismos involucrados en la puesta de huevos (Figura 6).

### 7.3. Análisis cromatográfico.

Se analizó el extracto acuoso de *Psidium guajava* dado que mostró una actividad de inhibición significativa de la locomoción y oviposición, por lo tanto se consideró importante evidenciar el tipo de componentes químicos presentes en el extracto.

Sin embargo la identidad de los tres componentes principales en el extracto (Figura 7) y su potencial antihelmíntico demandan experimentos adicionales.



**Figura 7. Análisis cromatográfico del extracto de *Psidium guajava*.** El extracto de *Psidium guajava* se analizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en un cromatógrafo Agilent 1200 (Palo Alto, CA, USA) sobre una columna analítica Synergi 4 mm Hydro-RP C<sub>18</sub> 80 Å (250 mm 4.6 mm, Phenomenex). La fase móvil fue acetonitrilo/agua con un gradiente de elución de 40% acetonitrilo entre los 0 y 15 min y 95% de acetonitrilo a partir del minuto 15, con un flujo de 0.80 ml/min. Los tiempos de elución de los picos señalados fueron 2.245 min (1), 2.427 min (2) y 3.379 min (3).

## 8.0. DISCUSIÓN

La evaluación de la capacidad antihelmíntica de plantas, es una de las alternativas que se investigan como solución a la resistencia hacia todos los tipos de fármacos antihelmínticos de amplio espectro disponibles actualmente. La investigación de productos naturales enfocados en la búsqueda de alternativas para el control de enfermedades, está fuertemente respaldada por el conocimiento tradicional en el uso de las plantas y ligada a que la medicina tradicional es la primera alternativa para el cuidado de la salud en países en desarrollo.

Programas de investigación global tal como GIBEX (global institute for bioexploration), centrados en la exploración farmacológica de productos naturales, en beneficio de la salud humana y el medio ambiente de países en desarrollo, tienen entre sus objetivos el ensayo de la actividad de extractos botánicos como primer paso para identificar nuevos antihelmínticos (Geary *et al.*, 2012). Cabe destacar que la evidencia científica sobre la eficacia antiparasitaria de los extractos botánicos, es limitada independientemente de su

amplio uso tradicional, por lo tanto su validación científica es necesaria antes de su adopción como un nuevo método para el control. Asimismo, es importante identificar la naturaleza de los componentes activos presentes en los extractos vegetales, ya que algunos metabolitos secundarios tales como alcaloides y taninos aunque tienen propiedades antiparasitarias, también tienen efectos anti-nutricionales (Githiori *et al.*, 2006).

Diversos métodos han sido explorados para validar el potencial antihelmíntico de extractos botánicos tanto *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo la principal ventaja de los ensayos *in vitro* es el bajo costo, la capacidad de poder evaluar un mayor número de plantas, así como la oportunidad para fraccionar un extracto y poder probar un compuesto purificado. De esta forma los ensayos *in vitro* han sido usados para hacer una detección inicial de la actividad antihelmíntica de las plantas (Lacey *et al.*, 1990). Los nematodos adultos son el mayor blanco para este tipo de estudios y es difícil mantenerlos en cultivos continuos cuando son parásitos, por lo tanto para pruebas *in vitro* una alternativa es el uso de nematodos de vida libre como *Caenorhabditis elegans*, *Rhabditis pseudoelongata* y *Pheritima posthuma* (Okpekon *et al.*, 2004; Akhtar *et al.*, 2000). La actividad antihelmíntica de las plantas utilizadas en esta investigación se evaluó a través de su efecto en la locomoción y reproducción del nematodo *C. elegans*.

#### 8.1. Efecto de los extractos sobre la motilidad de *C. elegans*

Se comprobó que a 25 mg/ml, todas las plantas a excepción de DA disminuyen de manera significativa la motilidad de los nematodos utilizados en los ensayos (en base al % de nematodos que presentan movimiento atípico o al % de parálisis), del tal forma que afectan el movimiento sinusoidal que típicamente presentan. Lo anterior es consistente con la hipótesis planteada de que los extractos tienen compuestos con efectos antihelmínticos sobre la locomoción del nematodo *C. elegans*.

El uso etnofarmacológico de PA y MV para tratar trastornos gastrointestinales (dolor de estómago, diarrea, gastritis y parásitos) ha sido documentado (Castillo J. *et al.*, 2009; Giovannini P. y Heinrich M. 2009), sin embargo no se ha realizado ningún ensayo *in vitro* donde se evalúe el efecto antihelmíntico de estas plantas. Los extractos de PA, y MV/t, sólo tienen un efecto de disminución de la motilidad sin llegar a la parálisis del nematodo, estos

extractos impiden que los nematodos presenten su movimiento sinusoidal que de manera natural se propaga a lo largo del cuerpo del nematodo, generando curvas corporales que propelen al gusano hacia adelante y hacia atrás. Frente a los extractos de PA y MV/t, el porcentaje de nematodos que presentan movimiento atípico a la octava hora de exposición, es significativamente mayor ( $p < 0.01$ ) que en el control negativo, (69.16% y 47.5% respectivamente de los nematodos se mueven atípicamente) (Figura 3). En contraste con estos datos, un estudio previo del efecto de extractos metanólicos de PA y MV, sobre el crecimiento de epimastigotes del parásito intracelular *Trypanosoma cruzi*, revela 61.32% y 98.99% respectivamente de inhibición del crecimiento después de haber sido expuestos 96 horas al extracto (Molina G. *et al.*, 2014).

El efecto antihelmíntico de DA no se evidenció en este estudio, esto contrasta con los resultados obtenidos por MacDonald *et al.* (2004), que reportan que la actividad nematicida de una infusión de epazote (*Dysphania ambrosioides*) sobre *C. elegans* adultos, es del 100% de mortalidad. La sobrevivencia de los nematodos utilizados en el estudio de MacDonald *et al.* (2004), fue medida de 12 a 13 horas de haber sido expuestos a la infusión, por lo tanto es probable que el tiempo de exposición no permitiera evidenciar el efecto antihelmíntico en nuestro estudio.

*Psidium guajava* en contraste con las otras plantas evaluadas aquí, tiene un efecto inhibitorio contundente sobre el comportamiento de locomoción de *C. elegans*, el efecto del extracto puede ser de parálisis o solo de disminución en el movimiento dependiendo de la dosis y el tiempo de exposición (efecto dosis-dependiente). A partir de 1 mg/ml hay una parálisis significativa a las ocho horas de exposición ( $p < 0.001$ ), cabe señalar que los nematodos que no presentan parálisis en las primeras horas de exposición, se observaron con un movimiento atípico (Figura 1E y 2). A 1 mg/ml menos del 3% de los nematodos presentan movimiento sinusoidal. A 25 mg/ml desde la segunda hora de exposición el total de la población se encuentra paralizada (Figura 1E).

El uso fitoterapéutico de PG se registra en América más que en otras regiones del mundo (Killion, 2000). México es uno de los países con una larga historia en el uso médico tradicional de esta planta (Lara y Márquez, 1996). Entre las enfermedades tratadas con PG se encuentran los trastornos gastrointestinales asociados con parásitos (Aguilar, *et al.*,

1994). Comúnmente raíces, corteza, hoja y frutos inmaduros se usan en el tratamiento de gastroenteritis, diarrea y disentería (Heinrich *et al.*, 1998). Estudios in vitro revelan que PG, tienen un efecto de 82.2% de mortalidad, sobre trozofitos de *Giardia lamblia* expuestos 24 horas a un extracto acuoso de corteza de la planta a 2.5 mg/ml (Brandelli *et al.*, 1999), en contraste con este estudio, en el que demostramos que a las ocho horas de exposición *P. guajava* está actuando sobre 50% de la población a 1 mg/ml, paralizando irreversiblemente a los nematodos. Asimismo estudios in vivo revelan la capacidad antiparasitaria de *P. guajava* sobre *Paraphistomum cervi*, en donde la mortalidad del parásito posterior a 24 horas de exposición al extracto obtenido con distintos solventes orgánicos, es de aproximadamente 70% a 2000 ppm, (Zahir *et al.*, 2009).

## 8.2. Efecto de los extractos sobre la motilidad de mutantes de *C. elegans*

Ivermectina y Levamisol son dos antihelmínticos de uso comercial para los que se ha reportado resistencia (Pichard, R.1994; Shoop, W. 1993), estos fármacos matan al nematodo *C. elegans* (cepa silvestre) a concentraciones terapéuticas (Cully *et al.*, 1994; Vassilatis *et al.*, 1997). Existen cepas de *C. elegans* con mutaciones en genes de función conocida (*avr-14* y *unc-29*) que son menos sensibles a estos fármacos. Por lo tanto probar sobre estas cepas, compuestos activos potencialmente antihelmínticos o extractos de plantas que los contengan, puede arrojar información relevante como primer paso en la investigación de un mecanismo de acción. Este estudio evidenció el efecto de parálisis del extracto de *Psidium guajava* a concentraciones de 10 y 25 mg/ml, sobre las cepas DA1371 (resistente a ivermectina) y CB193 (resistente a levamisol) de *C. elegans* (Figura 5). La cepa resistente a ivermectina, es poco sensible a la droga por la mutación del gen *avr-14* que codifica una subunidad tipo alfa del canal cloro-glutamato, sitio de acción del fármaco. Al haber un efecto de parálisis causado por el extracto en los nematodos de esta cepa (DA1371), sugiere que es probable que el sitio de acción de los componentes activos del extracto sea distinto al que impacta el fármaco. Lo mismo ocurre con la cepa resistente CB193, en este caso el sitio de acción de los compuestos activos del extracto, debería ser distinto a las subunidades proteicas que forman los canales iónicos nicotínicos del nematodo, sitio de acción del fármaco Levamisol.

### 8.3. Efecto de los extractos sobre la oviposición de *C. elegans*

La puesta de huevos en *C. elegans*, se produce cuando los músculos sexo específicos se contraen especialmente para la apertura de la vulva y permiten que los huevos sean expulsados. *C. elegans* hermafroditas son autofértiles y su tasa y patrón temporal de puesta de huevos se modulan por diversos estímulos o señales ambientales (Schafer, W. 2005), por lo tanto si los nematodos son expuestos a un estímulo externo tal como los extractos vegetales, es posible que estos modifiquen la tasa de oviposición. En este estudio se evidenció que PG tiene un efecto inhibitorio significativo ( $p < 0.001$ ), sobre la oviposición de *C. elegans* expuestos a 25 mg/ml durante una hora (Figura 6). El resto de las plantas probadas no demostraron inhibir la oviposición, probablemente el tiempo de exposición fue breve para evidenciar la actividad. Aunado al efecto que tiene PG sobre la oviposición, este estudio demostró el efecto de esta planta en la inhibición de la locomoción de adultos de *C. elegans*, lo cual es importante destacar debido a la relación de ambos comportamientos (locomoción y puesta de huevos). Específicamente la puesta de huevos está temporalmente correlacionada con la locomoción. Inmediatamente antes del evento de puesta, hay un incremento transitorio en la velocidad locomotora, además el movimiento en reversa es inhibido durante la puesta de huevos (Hardaker *et al.*, 2001). Lo que sugiere que si la locomoción es inhibida, es probable que la oviposición sea afectada. No obstante PG podría tener un efecto sobre los músculos vulvares Vm2, que se ha demostrado (White *et al.*, 1986) están críticamente involucrados en la puesta de huevos.

### 8.0. CONCLUSIONES

- Los componentes activos presentes en el extracto acuoso de *Psidium guajava*, poseen efectos inhibitorios significativos de la locomoción y oviposición de *C. elegans*, lo cual se considera un efecto antihelmíntico.
- El efecto inhibitorio que ejerce *P. guajava* sobre la locomoción de *C. elegans*, puede ser de parálisis o disminución gradual del movimiento, en respuesta a la dosis y tiempo de exposición.

- Los datos de movimiento atípico y número de coleteos, indican que a una concentración de 25 mg/ml, todas las plantas utilizadas en este estudio a excepción de *D. ambrosioides*, tienen la capacidad de disminuir gradualmente la locomoción de los nematodos, no obstante es probable que para evidenciar un efecto contundente de inhibición locomotora el tiempo de exposición debería ser mayor.
- La inhibición de la locomoción de *P. guajava*, sobre las cepas resistentes a levamisol e Ivermectina, sugieren que el sitio de acción de los componentes activos presentes en los extractos podría ser distinto al de estos fármacos de uso comercial, por lo tanto investigar un posible mecanismo de acción podría ser un paso lógico a seguir en esta investigación.
- La inhibición de la oviposición que ejerce *P. guajava*, podría estar relacionada con la disminución en la locomoción de los nematodos expuestos, o con el funcionamiento de los músculos sexo-específicos involucrados en la expulsión del huevo.

## 9.0. BIBLIOGRAFÍA

Abduz Z., Abdul R., Kamaraj C., Bagavan A., Elango G., Sangaran A. y Senthil K. 2009. Laboratory determination of efficacy of indigenous plant extracts for parasites control. *Parasitol Res.* 105:453–461.

Abe F., Nagafuji S., Okawa M., Kinjo J., Akahane H. Ogura T., Martínez A. y Reyes C. 2005. Trypanocidal Constituents in Plants 5. Evaluation of Some Mexican Plants for Their Trypanocidal Activity and Active Constituents in the Seeds of *Persea Americana*. *Biol. Pharm. Bull.* 28 (7) 1314—1317 (2005).

Adeyemi, O.O., Okpo, S.O., Ogunti, O.O., 2002. Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea Americana* Mill. (Lauraceae). *Fitoterapia* 73, 375–380.

Aguilar, A., Argueta, A., y Cano, L., 1994. *Flora Medicinal Indígena de México*. Instituto Nacional Indigenista, México.

Anon., 1996. Ethnoveterinary Medicine in Kenya: A Field Manual of Traditional Animal Health Practices. Intermediate Technology Development Group and International Institute of Rural Reconstruction, Nairobi, 226 pp.

Anthony, R.M., Rutitzky, L.I., Urban, J.F., Stadecker, M.J., Gause, W.C.. 2007. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol*; 7:975–87.

Akhtar, M.S., Iqbal, Z., Khan, M.N., Lateef, M., 2000. Anthelmintic activity of medicinal plants with particular reference to their use in animals in the Indo-Pakistan subcontinent. *Small Ruminant Res.* 38, 99–107.

Argueta, V.A., Cano, A.J., 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista, México 330 pp.

Argyropoulou, C., Karioti. A., Skaltsa, H. 2009. Labdane diterpenes from *Marrubium thessalum*. *Photochemistry*;70:635–40.

Agarwal, R.R., Dutt, S., 1935. Chemical examination of *Cuscuta reflexa* Roxb. Part I. The constituents. *Journal of Indian Chemical Society* 1, 384–388.

Bao X, Wang Z, Fang J, Li X. 2002. Structural features of an immunostimulating and antioxidant acidic polysaccharide from the seeds of *Cuscuta chinensis*. *Planta Medica*; 68(3):237–43.

Begum J, Yusuf M, Chowdhury JU, Wahab MA. 1993. Studies on essential oils for their anti bacterial and anti-fungal properties. Part 1. Preliminary screening of 35 essential oils. *Bangladesh J Sci Ind Res* 28: 25–34.

Behnke JM, Buttle DJ, Stepek G, Lowe A, Duce IR. 2008. Developing novel anthelmintics from plant cysteine proteinases. *Parasit Vectors*;1:29.

Berrougui, H., Isabelle, M., Cherki, M. y Khalil, A. 2006. *Marrubium vulgare* extract inhibits human-LDL oxidation and enhances HDL-mediated cholesterol efflux in THP-1 macrophage. *Life Sci*;80:105–12.

Bizimana, N. Traditional veterinary practice in Africa. 1994. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) Rossdorf, Germany, 917 p.

Boiteau P. 1986. Médecine Traditionnelle et Pharmacopée: Précis de Matière Médicale Malgache. Agence de Coopération Culturelle et Technique: Paris.

Bourrel C, Vilarem G, Michel G, Gaset A. 1995. Etude des propriétés bactériostatiques et fongostatiques en milieu solide de 24 huiles essentielles préalablement analysées. *Rivista Ital EPPOS* 16:3–12.

Botana, L., Landoni, F. y Jiménez, T. 2002. *Farmacología y terapéutica veterinaria*, Edit. McGraw Hill. Interamericana. Madrid, España. p. 564-570.

Brandelli C., Giordani B., Attilio D. y Tasca T. 2009. Indigenous traditional medicine: in vitro anti-giardial activity of plants used in the treatment of diarrhea. *Parasitol Res.* 104:1345-1349.

British Veterinary Codex, 1965. *British Veterinary Codex*. The Pharmaceutical Press, London.

Brunet, S., Jackson, F. y Hoste, H., 2008. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. *Int. J. Parasitol.* 38, 783–790.

Cabanis Y, Chabouis L, Chabouis F. 1970. *Végétaux et Groupements Végétaux de Madagascar et des Mascareignes*, Vol. 2. Bureau pour le Développement de la Production Agricole (BDPA): Tananarive.

Cabieses, M.F., 1993. *Apuntes de la Medicina Tradicional: la racionalidad de lo irracional*. II. Lima Perú, pp. 123–128.

Castillo J., González V., Jaime A., Martínez G., Linares E., Bye R. y Romero T. 2009. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*. y 122 (2009) 402–405.

Chopra, R.N., Nayer, S.L., Chopra, I.C., 1992. *Glossary of Indian Medicinal Plants*, Publication and Information Directorate, CSIR, New Delhi, p. 85.

Çitoglu, G.S., Aksit, F. 2002. Occurrence of marrubiin and ladanein in *Marrubium trachyticum* Boiss. from Turkey. *Biochem Syst Ecol* ;30:885–6.

Conway, P., 2002. *Tree Medicine: A Comprehensive Guide to the Healing Power of Over 170 Trees*. Judy Piatkus (Publishers) Ltd, pp. 2173– 2177.

Cully, D., Vassilatis, D., Liu, K., Paress, P., Van der P., Schaeffer y Arena, J. 1994. *Nature* (London) 371, 707–711.

de Bono, M., Maricq, A.V. 2005. Neuronal substrates of complex behaviours in *C. elegans*. *Annu Rev Neurosci.* 28:451-501.

- Delile, L. 2007. Les plantes médicinales d'Algérie. Alger: Berti.
- Du, X.M., Kohinata, T., Guo, Y.T. y Kazumoto, M. 1998. Components of the etherinsoluble resin glycoside-like fraction from *Cuscuta chinensis*. *Phytochemistry*;48:843–50.
- Eguale, T., Tilahun, G., Debella, A., Feleke, A. y Makonnen, E., 2007. *Haemonchus contortus*: in vitro and in vivo anthelmintic activity of aqueous and hydro-alcoholic extracts of *Hedera helix*. *Exp. Parasitol.* 116, 340–345.
- Etkin, N., Ross, P.J. y Muazzumu, I. 1990. The indigenization of pharmaceuticals: therapeutic transition in rural Hausaland. *Social Science and Medicine* 30, 919–928.
- Erdogan-Orhan, I., Belhattab, R., Şenol, F.S., Gülpinar, A.R., Hosbas, S. y Kartal, M. 2010. Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Artemisia absinthium*, *A. herba alba*, *A. fragrans*, *Marrubium vulgare*, *M. astranicum*, *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* and essential oil analysis of two *Artemisia* species. *Ind Crops Prod*;32:566–71.
- Faizi, S., Fayyaz, S., Bano, S., Yawar-Iqbal, E., Siddiqi, H. y Naz, A. 2011. Isolation of Nematicidal Compounds from *Tagetes patula* L. Yellow Flowers: Structure-Activity Relationship Studies against Cyst Nematode *Heterodera zae* Infective Stage Larvae. *J. Agric. Food Chem.* (in press.)
- Geary, T.G., y Thompson, D.P. 2001. *Caenorhabditis elegans*: how good a model for veterinary parasites? *Vet. Parasitol.* 101, 371–386
- Giovannini P. y Heinrich M. 2009. Xki yoma' (our medicine) and xki tienda (patent medicine)—Interface between traditional and modern medicine among the Mazatecs of Oaxaca, Mexico. *Journal of Ethnopharmacology.* 121 (2009) 383–399.
- Giron, L.M., Freire, V., Alonzo, A. y Caceres, A. J. 1991. *Ethnopharmacol.* 34:173.
- Githiori, J.B., Höglund, J., Waller P. y Baker L. 2003. Evaluation of anthelmintic properties of extracts from some plants used as livestock dewormers by pastoralist and smallholder farmers in Kenya against *Heligmosomoides polygyrus* infections in mice. *Veterinary Parasitology* 118, 215–226.
- Guarrera, P.M. 1999. Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in Central Italy. *J. Ethnopharmacol.* 68, 183–192.
- Gupta, M.P., Arias, T.D., Correa, M. y Lamba, S.S. 1979. *J Crude Drug Res*;17:115.

- Gupta, M., Mazumder, U.K., Pal, D.K. y Bhattacharya, S. 2003. Anti-steroidogenic activity of methanolic extract of *Cuscuta reflexa* Roxb. stem and *Corchorus olitorius* Linn. seed in mouse ovary. *Indian Journal of Experimental Biology* 41, 641–644.
- Hammond, J.A., Fielding, D. y Bishop, S.C. 1997. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. *Vet. Res. Commun.* 21, 213–228.
- Hardaker, L.A., Singer, E., Kerr, R., Zhou, G., and Schafer, W.R. 2001. Serotonin modulates locomotory behavior and coordinates egg-laying and movement in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurobiol.* 49, 303–313.
- Heinrich, M., Ankli, A., Frei, B., Weimann, C., Sticher, O. 1998. Medicinal plants in Mexico: healers consensus and cultural importance. *Social Science and Medicine* 47, 1859–1871.
- Herrera-Arellano, A., Aguilar-Santamaría, L., García-Hernández, B., Nicasio-Torresa, P. y Tortoriello, J. 2004. Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics. *Phytomedicine.* 11:561–6.
- Henrotin, Y.E., Deberg Ma, Crielaard, J.M., Piccardi, N.M.P., Sanchez, C. 2006. Avocado/soybean unsaponifiables prevent the inhibitory effect of osteoarthritic subchondral osteoblasts on aggrecan and type II collagen synthesis by chondrocytes. *The Journal of Rheumatology* 33, 1668–1678.
- Hmamouchi M, Lahlou M, Agoumi A. 2000. Molluscicidal activity of some Moroccan medicinal plants. *Fitoterapia* 71:308–314.
- Holden L. y Walker R. 2007. Anthelmintic drugs. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.143.1, <http://www.wormbook.org>.
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M. y Hoskin, S.O. 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol.* 22, 253–261.
- INEGI. 1999. Cuadernos de Información Estadística del Sector Salud y Seguridad Social. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. México.
- Jasmer, D.P., Govere, A.P. y Smant, G. 2003. Parasitic nematode interactions with mammals and plants. *Annu Rev Phytopathol* 41: 245-270
- John B. Githiori, Spiridoula Athanasiadou y Stig M. Thamsborg. 2006. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Veterinary Parasitology* 139 (2006) 308–320.

Johnson, M.A., Croteau, R. 1984. Biosynthesis of ascaridole: iodide peroxidase-catalyzed synthesis of a monoterpene endoperoxide in soluble extracts of *Chenopodium ambrosioides* fruit. *Archives of Bio-chemistry and Biophysics* 235, 254–266.

Jones, A.K., Buckingham, S.D. y Sattelle, D.B. 2005. Chemistry-to-gene screens in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 4, 321–330.

Kaminsky R, Gauvry N, Schorderet Weber S, Skripsky T, Bouvier J, Wenger A, Schroeder F, Desaulles Y, Hotz R, Goebel T, Hosking BC, Pautrat F, Wieland-Berghausen S, Ducray P. 2008. Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. *Parasitol Res.* 103:931–939.

Kaplan, R.M. 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol* 20: 477-481.

Katiki, M., Ferreira, F., Zajacc, M., Maslerd, C., Lindsay, S., Chagase, S. y Amarantef, F. 2011. *Caenorhabditis elegans* as a model to screen plant extracts and compounds as natural anthelmintics for veterinary use. *Veterinary Parasitology*.

Killion, K.H. 2000. *The Review of Natural Products*, third ed. Facts and Comparison, USA, pp. 250–251.

Kirtikar, K.R. y Basu, B.D. 2001. *Indian Medicinal Plants*, 3rd ed. vol. 8. Sri Satguru Publications, Delhi, pp. 2401–2403.

Kliks, M.M., 1985. Studies on the traditional herbal anthelmintic *Chenopodium ambrosioides* L.: ethnopharmacological evaluation and clinical fields trials. *Social Science and Medicine* 21, 879–886.

Lacey, E., Redwin, J.M., Gill, J.H., Demargheriti, V.M., Waller, P.J. 1990. A larval development assay for the simultaneous detection of broad spectrum anthelmintic resistance. In: Boray, J.C., Martin, P.J., Roush, R.T. (Eds.), *Resistance of Parasites to Antiparasitic Drugs*. MSD Agvet, Rahway, NY, pp. 177–184.

Lall N, Meyer JJM. 1999. In vitro inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants. *J Ethnopharmacology* 66: 347–354.

Lara, O.F., Marquez, A.C. 1996. *Plantas Medicinales de México. Composicion Usos y Actividad Biológica*. UNAM, México, D.F, pp. 137–139.

Lee, S., Chen, C.J., Wan, L., Koizumi, A., Chang, W., Yang, M., Lin, W., Tsai, F. y Lin M. 2011. Quercetin is increased in heat-processed *Cuscuta campestris* seeds, which enhances

the seed's anti-inflammatory and anti-proliferative activities. *Process Biochemistry* 46 2248–2254.

Levy, R.L. 1914. Oil of *Chenopodium* in the treatment of hookworm infections. *Journal of the American Medical Association* 63, 1946–1949.

MacDonald D., VanCrey K., Harrison P., Rangachari P.K., Rosenfeld J., Warren C. y Sorger G. 2004. Ascaridole-less infusions of *Chenopodium ambrosioides* contain a nematocide(s) that is(are) not toxic to mammalian smooth muscle. *Journal of Ethnopharmacology* 92 (2004) 215–221

Martin, M., Mathias, E. y McCorkle, C.M. 2001. *Ethnoveterinary Medicine: An Annotated Bibliography of Community Animal Healthcare*. ITDG Publishing, London, UK.

McGaw, L.J., Jäger, A.K. y van Staden, J. 2000. Antibacterial, anthelmintic and antiamebic activity in South African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 72, 247–263.

McGaw, L.J., Van der Merwe, D. y Eloff, J.N. 2007. In vitro anthelmintic, antibacterial and cytotoxic effects of extracts from plants used in South African ethnoveterinary medicine. *Vet. J.* 173, 366–372.

Mejía, K. y Rengifo, E. 2000. *Plantas Medicinales de Uso Popular en la Amazonía Peruana*, 2a ed. Tarea Asociación Gráfica Educativa, Lima Perú.

Meyre-Silva, C., Yunes, R.A., Schlemper, V., Campos-Buzzi, F. y Cechinel-Filho, V. 2005. Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpene present in *Marrubium vulgare* (Lamiaceae). *Il Farmaco*. 60:321–6.

Millsbaugh, C.F., 1892. *Medicinal Plants*, vol. 2. Yorston & Co., Philadelphia, PA, USA.

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

Mitchell, S.A. y Ahmad, M.H. 2006b. Protecting our medicinal plant heritage: the making of a new national treasure. *Jamaica Journal*, Institute of Jamaica, Kingston 29, 28–33.

Mitreval M., Blaxter L., Bird M. y McCarter P. 2005. Comparative genomics of nematodes. *Trends in Genetics* 21:10.

Molina G., Bazaldúa R., Quintanilla L. y Galaviz S. 2014. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of 10 medicinal plants used in northeast Mexico. *Acta tropica*. 136. 14–18.

- Morton, J.F. 1980. Atlas of Medicinal Plants of Middle America: Bahamas to Yucatan. Charles C. Thomas Publishers, Springfield, IL, USA.
- Nawwar, M.A., El-Mousallamy, A.M., Barakat, H.H., Buddrus, J. y Linscheid, M. 1989. Flavonoid lactates from leaves of *Marrubium vulgare*. *Phytochemistry*. 28:3201–6.
- Nelson, E.K. 1920. The composition of oil of *Chenopodium* from various sources. *Journal of the American Chemical Society* 42, 1204–1208.
- Ngokwey, N. 1995. Home remedies and doctors' remedies in Feira (Brazil). *Social Science and Medicine* 40, 1141–1153.
- Noumi E, Yomi A. 2001. Medicinal plants used for intestinal diseases in Mbalmayo Region, Central Province, Cameroon. *Fitoterapia* 72: 246–254.
- Oh, W.K., Lee, C.H., Lee, M.S., Bae, E.Y., Sohn, C.B., Oh, H., Kim, B.Y. y Ahn, J.S. 2005. Antidiabetic effects of extracts from *Psidium guajava*. *Journal of Ethnopharmacology* 96, 411–415.
- Ojewole, J.A. 2005. Hypoglycemic and hypotensive effects of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 27, 689–695.
- Okpekon, T., Yolou, S., Gleye, C., Roblot, F., Loiseau, P., Bories, C., Grellier, P., Frappier, F., Laurens, A., Hocquemiller, R. 2004. Antiparasitic activities of medicinal plants used in Ivory Coast. *J. Ethnopharmacol.* 90, 91–97.
- Oostenbrink, M., Kuiper, K. y S'Jacob, J.J. 1957. *Tagetes* als feindpflanzen von *Pratylenchus*-arten. *Nematologica* 2, 424–433.
- Pal, D.K., Vamsi, M.L., Shivakumar, T., Gupta, M. y Mazumder, U.K. 2002. The studies on antifertility effect of methanol extract of *Corchorus olitorius* seed on the gonads of matured male albino mice. In: *Proceedings of the 54th Indian Pharmaceutical Congress, Pune D2.*, p. 53.
- Paget, H. 1926. The determination of ascaridole in *Chenopodium* oil. *Analyst* 51, 170–176.
- Papadopoulos, E., Gallidis, E. y Ptochos, S. 2012. Anthelmintic resistance in sheep in Europe: A selected review. *Veterinary Parasitology* 189:85– 88.
- Papoutis, Z., Kassi, E., Mitakou, S., Aligiannis, N., Tsiapara, A. y Chrousos, G.P. 2006. Acteoside and martynoside exhibit estrogenic/antiestrogenic properties. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 98:63–71.

- Pardo, O. 1999. Estudio comparativo de ocho especies Americanas de uso medicinal en Mozambique. *Revista Chilena de Flora y Vegetación* 1, 323–328.
- Parker, C. 1991. Protection of crops against parasitic weeds. *Crop. Prot.* 10(1). 6-22.
- Paterson, S. y Barber, R. 2007. Experimental evolution of parasite life-history traits in *Strongyloides ratti* (Nematoda). *Proc Biol Sci.* 274:1467–74.
- Prichard, R. 1994. *Vet. Parasitol.* 54, 259 –268.
- Rao, V.S., Dasaradhan, P. y Krishnaiah, K.S. 1979. Antifertility effect of some indigenous plants. *Indian Journal of Medical Research* 70, 517–520.
- Rodrigues, C.A., Savi, A.O., Schlemper, V., Reynaud, F. y Cechinel-Filho, V. 1998. An improved extraction of marrubiin from *Marrubium vulgare*. *Chromatographia.* 47:449–50.
- Rostogi, R.P. y Mehrotra, B.N. 1993. *Compendium of Indian Medicinal Plants*, vol. 1. CDRI, Lucknow, p. 137.
- Sahpaz, S., Garbacki, N., Tits, M. y Bailleul, F. 2002. Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*. *J Ethnopharmacol.* 79:389–92.
- Schafer, W.R., Sanchez, B.M., and Kenyon, C.J. 1996. Genes affecting sensitivity to serotonin in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 143, 1219–1230.
- Schillhorn van Veen, T.W. 1997. Sense or nonsense. Traditional methods of animal parasitic disease control. *Veterinary Parasitology* 71, 177–194.
- Shoop, W. 1993. *Parasitol. Today* 9, 154 –158.
- Siddiqui, M.A. y Alam, M.M. 1987. Control of plant-parasitic nematodes by intercropping with *Tagetes minuta*. *Nematol. Medit.* 15, 205–211.
- Simpkin, K.G., Coles, G.C. 1981. The use of *Caenorhabditis elegans* for anthelmintic screening. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 31, 66– 69.
- Smillie, W.G., Pessoa, S.B. 1924. A study of the anthelmintic properties of the constituents of the oil of *Chenopodium*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 24, 359–370.
- Soliman, F. 2012. Evaluation of avocado/soybean unsaponifiable alone or concurrently with praziquantel in murine schistosomiasis. *Acta Tropica* 122 (2012) 261–266.

Steiner, G. 1941. Nematodes parasitic on and associated with roots of marigold (*Tagetes hybrida*). Proc. Biol. Soc. Wash. 54, 31–34.

Stone, B. 1970. The flora of Guam. *Micronesica* 6, 454–455.

Suatmadji, R.W. 1969. Studies on the effect of *Tagetes* species on plant parasitic nematodes. H. Veenman en Zonen, Wageningen, The Netherlands, 132 pp.

Thompson, D.P., Klein, R.D. y Geary, T.G. 1996. Prospects for rational approaches to anthelmintic discovery. *Parasitology* 113, S217–S238.

Vassilatis, D., Arena, J., Plasterk, R., Wilkinson, H., Schaeffer, J., Cully, D. y Van der Ploeg, L. 1997. *J. Biol. Chem.* 272, 33167–33174

Waller, P.J., Bernes, G., Thamsborg, S.M., Sukura, A., Richter, S.H., Ingebrigtsen, K. y Hoglund, J. 2001. Plants as de-worming agents of livestock in the Nordic countries: historical perspective, popular beliefs and prospects for the future. *Acta Vet. Scand.* 42, 31–44.

Waldstein, A. 2006. Mexican migrant ethnopharmacology: pharmacopeia, classification of medicines and explanations of efficacy. *Journal of Ethnopharmacology* 108, 299–310.

Wang, K.H., Sipes, B.S. y Schmitt, D.P. 2001. Suppression of *Rotylenchulus reniformis* by *Crotalaria juncea*, *Brassica napus*, and *Tagetes erecta*. *Nematropica* 31 (2), 235–249.

Wanyama, J.B. 1997a. Confidently used ethnoveterinary knowledge among pastoralists of Samburu, Kenya: methodology and results. *Methodology and Results*, vol. 1. Intermediate Technology Kenya, Nairobi, 82 p.

Wanyama, J.B. 1997b. Confidently used ethnoveterinary knowledge among pastoralists of Samburu, Kenya: preparation and administration. *Preparation and Administration*, vol. 2. Intermediate Technology Kenya, Nairobi, 109 p.

Watt, J.M. y Breyer-Brandwijk, M.G. 1962. The medicinal plants and poisonous plants of Southern and Eastern Africa, 2nd ed. Edinburgh E & S Livingstone Ltd.

White, J., Southgate, E., Thomson, N., and Brenner, S. 1986. The structure of the *Caenorhabditis elegans* nervous system. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 314, 1–340.

Yadav, S.B., Tripathy, V., Singh, R.K. y Pandey, H.P. 2000. Antioxidant activity of *Cuscuta reflexa* stems. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 6, 477–478.

Yang, J., Wang, Y., Bao, Y. y Guo, J. 2008. The total flavones from Semen cuscutae reverse the reduction of testosterone level and the expression of androgen receptor gene in kidney-yang deficient mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 119:166–71.

Ye, M., Yan, Y.N., Qiao, L. y Ni, X.M. 2002. Studies on chemical constituents of *Cuscuta chinensis*. *China Journal of Chinese Materia Medica*. 27:115–7.

Yen, F.L., Wu, T.H., Lin, L.T. y Lin, C.C. 2007. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Cuscuta chinensis* against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 111(1):123–8.