



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EFFECTO ANTIHELMÍNTICO *in vitro* DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS
(CUMARINA:QUERCETINA Y ÁCIDO CAFEICO:RUTINA) SOBRE LA
MOTILIDAD DE LARVAS INFECTANTES Y PARÁSITOS ADULTOS DE *Cooperia*
punctata.

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

Presenta:

ESTEFANIA ZÚÑIGA OLIVOS

Asesora:

DRA. ELKE VON SON DE FERNEX

Ciudad Universitaria, Cd.Mx., 2022.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



JURADO DE EXAMEN PROFESIONAL

Dr. Osvaldo Froylán Ibarra Velarde
Presidente

Dr. Miguel Ángel Alonso Díaz
Vocal

Dra. Cintli Martínez Ortiz de Montellano
Secretaria

Dr. Agustín Fernández Salas
Suplente

Dra. Elke von Son de Fernex
Suplente

DEDICATORIA

A mis padres:

Alejandra Olivos Yáñez

Luis Zúñiga Taboada

AGRADECIMIENTOS

Mamá, un “GRACIAS” me parece insuficiente para reconocerte y agradecerte por todo lo que hiciste en el camino andado. Sin embargo, no tengo otra palabra con la que pueda hacerte saber y sentir lo muy agradecida que me siento contigo y lo mucho que valoro tu esfuerzo y dedicación para que yo concluyera mi vida profesional. De verdad, GRACIAS POR TANTO.

Papá, sin lugar a duda, eres la persona que en estos últimos años me ha brindado las herramientas necesarias para la culminación de mi vida estudiantil, un GRACIAS tampoco me alcanza para expresarte lo muy agradecida que me siento contigo, por todo el apoyo y paciencia que tienes conmigo. Pero aun así, ¡MUCHAS GRACIAS!, eres la persona más buena de mi mundo.

Aliveth, hermana, cada etapa estudiantil es vulnerable, te agradezco las pláticas que tuvimos y lo mucho que me sirvieron para retomar el camino y comportarme a consciencia.

Chio (Rocio Estrada) en el momento más difícil de este proyecto surgió nuestra amistad y fue lo más sensible y acogedor que me pudo haber pasado. Te convertiste en mi persona favorita y agradezco infinitamente la compañía, tus palabras, los ánimos y el cariño que me brindaste en esos momentos.

Alondra, no imaginas lo mucho que me apoyaste. Valoro mucho y agradezco el tiempo que me dedicaste explicando, ayudando, los ánimos que me dabas para no rendirme y por todas las atenciones que tuviste conmigo durante esto.

Francisco Martínez, tu interés por el aprendizaje y el conocimiento resulto benéfico para mí en esta investigación. Gracias por auxiliarme en los puntos más cruciales de este proyecto, por facilitarme algunas cosas, por convertir todas mis dudas y

preguntas en respuestas, por decirme las palabras que debía escuchar y por el apoyo mental y emocional. Te debo varias.

Lety León, siempre es grato estar y contar con personas como tú que te ofrecen una ayuda incondicional y además comparten su conocimiento.

Dra. Reyna Lara, por la paciencia y dedicación que brindo al proyecto, por sus consejos, enseñarme, explicarme y atenciones conmigo, GRACIAS.

Erick Parra, gracias por estar y por tu apoyo incondicional.

Gracias, **ODGR**, por los ánimos, la compañía a distancia y por hacerme ver la lección aprendida de este proyecto, además, por todas y cada una de las veces que me escuchaste, por tu franqueza y ser mi consuelo.

Dra. Elke, en el transcurso del proyecto no solo aprendí y me enseñó aspectos de la academia, sino otros tantos fuera de, GRACIAS por ello, por permitirme participar en esto y por confiar en mí.

CONTENIDO

I.	RESUMEN	13
II.	INTRODUCCIÓN	14
III.	REVISIÓN DE LITERATURA	17
	3.1. Ganadería bovina de doble propósito en México.....	17
	3.2. Generalidades de los nematodos gastrointestinales.....	18
	3.2.1. Ciclo biológico de los NGI.....	20
	3.2.2. <i>Cooperia punctata</i>	22
	3.3. Impacto de las nematodosis gastrointestinales en la producción bovina.....	23
	3.4. Alternativas para el control de nematodos gastrointestinales.....	26
	3.4.1. Control químico.....	26
	3.5. Resistencia antihelmíntica.....	28
	3.6. Compuestos polifenólicos.....	30
	3.6.1. Ácido cafeico.....	31
	3.6.2. Cumarina.....	31
	3.6.3. Quercetina.....	32
	3.6.4. Rutina.....	33
	3.7. Herramientas para determinar el mecanismo de acción de moléculas con potencial antihelmíntico.....	34
	3.7.1. Microscopia electrónica de barrido y de transmisión.....	35
IV.	HIPÓTESIS	37
V.	OBJETIVO GENERAL	37
VI.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37

VII.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
	7.1. Área de estudio	38
	7.2. Compuestos polifenólicos	38
	7.3. Material biológico.....	38
	7.4. Técnicas parasitológicas.....	39
	7.4.1. Obtención de larvas infectantes.....	39
	7.4.2. Obtención de parásitos adultos.....	39
	7.5. Bioensayos.....	40
	7.5.1. Inhibición de la motilidad larvaria.....	40
	7.5.2. Inhibición de la motilidad del adulto.....	40
	7.6. Preparación de muestras para Microscopia Electrónica de Barrido y de Transmisión	41
	7.7. Análisis estadísticos.....	43
VIII.	RESULTADOS	44
	8.1. Efecto de las combinaciones cumarina:quercetina y ácido cafeico:rutina contra la motilidad de la L ₃ de <i>C. punctata</i> ...	44
	8.2. Efecto de las combinaciones cumarina:quercetina y ácido cafeico:rutina contra la motilidad del adulto de <i>C. punctata</i>	45
	8.3. Cambios estructurales en L ₃ de <i>C. punctata</i>	47
	8.4. Cambios estructurales en adultos de <i>C. punctata</i>	48
	8.5. Cambios ultraestructurales en L ₃ de <i>C. punctata</i>	49
	8.6. Cambios ultraestructurales en adultos de <i>C. punctata</i>	52
IX.	DISCUSIÓN.....	59
X.	CONCLUSIÓN.....	65
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1.** Géneros de nematodos más comunes que afectan el ganado bovino en el trópico.
- Cuadro 2.** Familias antihelmínticas, sus principales moléculas comerciales, mecanismo de acción y espectro.
- Cuadro 3.** Mecanismos de resistencia a las principales familias químicas.
- Cuadro 4.** Concentraciones y porcentajes de inhibición de la motilidad.
- Cuadro 5.** Concentración efectiva media (CE_{50}), intervalo de confianza (IC) y coeficiente de correlación (R^2) de las combinaciones de compuestos polifenólicos contra la motilidad en el adulto de *C. punctata*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Sección transversal de un nematodo a nivel de esófago.
- Figura 2.** Sistema reproductor del macho y la hembra de nematodos.
- Figura 3.** Ciclo biológico de los nematodos gastrointestinales.
- Figura 4.** Aparato reproductor del macho de *C. punctata*.
- Figura 5.** Estructura química de ácido cafeico.
- Figura 6.** Estructura química de cumarina.
- Figura 7.** Estructura química de quercetina.
- Figura 8.** Estructura química de rutina.
- Figura 9.** Efecto de las concentraciones crecientes de la combinación cumarina:quercetina sobre la motilidad de *Cooperia punctata* en diferentes tiempos (6, 12, 24 h).
- Figura 10.** Efecto de las concentraciones crecientes de la combinación ácido cafeico:rutina sobre la motilidad de *Cooperia punctata* en diferentes tiempos (6, 12, 24 h).
- Figura 11.** Larvas infectantes de *Cooperia punctata* observadas mediante Microscopía Electrónica de Barrido posterior a su incubación por 3 h en etanol al 2.5% (control negativo; A1-3); cumarina:quercetina (B1-3); ácido cafeico:rutina (C1-3); y Tiabendazol (D1-3).

Figura 12. Parásitos adultos de *Cooperia punctata* observados mediante Microscopía Electrónica de Barrido posterior a su incubación por 24 h en etanol al 2.5 % (control negativo; A1-4); cumarina:quercetina (B1-4) y ácido cafeico:rutina (C1-4).

Figura 13. Larvas infectantes de *Cooperia punctata* observadas mediante Microscopía Electrónica de Transmisión posterior a su incubación por 3 h en etanol al 2.5 % (control negativo; A1-2); cumarina:quercetina (B1-2); ácido cafeico:rutina (C1-2) y Tiabendazol (D1-2).

Figura 14. Larvas infectantes de *Cooperia punctata* observadas mediante Microscopía Electrónica de Transmisión posterior a su incubación por 3 h en etanol al 2.5 % (control negativo; A1-2); cumarina:quercetina (B1-2); ácido cafeico:rutina (C1-2) y Tiabendazol (D1-2).

Figura 15. Parásitos adultos de *Cooperia punctata* observados mediante Microscopía Electrónica de Transmisión posterior a su incubación por 24 h en etanol al 2.5 % (control negativo; A1-3); cumarina:quercetina (B1-3) y ácido cafeico:rutina (C1-3).

Lista de abreviaturas

AH	Antihelmítico (a)
CE ₅₀	Concentración efectiva media
CPf's	Compuestos polifenólicos
CCL	Crestas cuticulares longitudinales
2D	Dos dimensiones
EE	Error estándar
GDP	Ganancia diaria de peso
gp-P	Glicoproteínas P
gr	Gramos
h	Horas
IC	Intervalo de confianza
IMA	Inhibición de la migración larvaria
IML	Inhibición de la motilidad del adulto
km	Kilómetros
kg	Kilogramos
kv	Kilovoltaje
L ₁	Larva 1
L ₂	Larva 2
L ₃	Larva 3
L ₄	Larva 4
MS	Materia seca
MSP	Metabolitos secundarios de las plantas
msnm	Metros sobre el nivel del mar
MEB	Microscopia electrónica de barrido
MET	Microscopia electrónica de transmisión
mg	Miligramos
mm	Milímetros

nm	Nanómetros
NGI	Nematos gastrointestinales
PECL	Patrón de estrías cuticulares longitudinales
PECT	Patrón de estrías cuticulares transversales
pH	Potencial de hidrógeno
PBS	Solución buffer de fosfatos
RA	Resistencia antihelmíntica
R ²	Coefficiente de correlación
3D	Tercera dimensión
TGI	Tracto gastrointestinal
UPB	Unidades de producción bovina

I. RESUMEN

ZÚÑIGA OLIVOS ESTEFANIA. Efecto antihelmíntico *in vitro* de compuestos polifenólicos (cumarina:quercetina y ácido cafeico:rutina) sobre la motilidad de larvas infectantes y adultos de *Cooperia punctata* (bajo la dirección de: Dra. Elke von Son de Fernex).

Uno de los principales problemas de salud animal que enfrenta la ganadería bovina en regiones tropicales son las nematodosis gastrointestinales. *Cooperia punctata* se ha clasificado como la especie de *Cooperia* spp con mayor patogenicidad y prevalencia en las regiones tropicales. Tradicionalmente, su control se ha basado en la administración de antihelmínticos; sin embargo, su uso indiscriminado ha favorecido a la emergencia de resistencia antihelmíntica. Por lo cual, el uso de metabolitos secundarios de las plantas (MSP), como los compuestos polifenólicos, se han propuesto como una alternativa de control. Los objetivos de este estudio fueron evaluar la combinación cumarina:quercetina (CuQ) y ácido cafeico:rutina (CaR) en una proporción de 8:2 sobre la motilidad de L₃ y parásitos adultos de *C. punctata*, mediante el bioensayo de Inhibición de la Migración Larvaria e Inhibición de la Motilidad del Adulto. La combinación CuQ mostró un porcentaje de IML de 3.82 ± 1.87 y CaR de 13.95 ± 4.84 . La IMA a las 12 y 24 h post-incubación con CaR fue de 87.01 % y 86.90 %, respectivamente; contrario a lo observado con CuQ, donde se observó un incremento de inhibición de motilidad a la máxima concentración de 73.81 % y 100 % a las 12 y 24 h, respectivamente. Las alteraciones principales observadas en L₃ como parásitos adultos con Microscopia Electrónica de Barrido y de Transmisión fueron sobre las siguientes estructuras: i) complejo vaina-cutícula de L₃, se observó una pérdida de la continuidad de las membranas, degradación de las bandas colágenas de la zona basal de la vaina y degradación de las bandas colágenas presentes en las especializaciones laterales de la capa interna de la vaina; ii) alteraciones en la electrodensidad, ángulo y longitud de las fibras helicoidales, iii) leve a moderada degeneración de miofibrillas delgadas en los sarcómeros, en L₃ y adultos, respectivamente; iv) tumefacción mitocondrial y v) apoptosis celular.

Palabras clave:

Bovinos, nematodos gastrointestinales, *Cooperia punctata*, compuestos polifenólicos, efecto antihelmíntico.

II. INTRODUCCIÓN.

México tiene una extensión territorial de 1.964 millones de km², de los cuales 109.8 millones de hectáreas están destinadas para el sector ganadero (CONAGUA, 2017; SIAP 2018). En el país, el 25 % del territorio nacional corresponde al área tropical, región en la que 80 % de las unidades de producción bovina (UPB) corresponden a sistemas de producción de doble propósito (Koppel *et al.*, 2002; Magaña *et al.*, 2006); dentro de las cuales 2.8 millones de cabezas de bovino se alimentan mediante sistemas nutricionales de pastoreo continuo (Vilaboa *et al.*, 2009; Orantes *et al.*, 2014; INEGI, 2017).

En el estado de Veracruz, la actividad ganadera ocupa el 50.6 % de su extensión territorial (Herrera *et al.*, 2005) y el 38 % de las UPB son manejadas bajo un sistema de doble propósito, para la obtención de carne y leche (Vilaboa *et al.*, 2009). Debido a que los animales se mantienen bajo este sistema de pastoreo continuo uno de los principales problemas de salud animal que enfrentan estas UPB son las parasitosis causadas por nematodos gastrointestinales (NGI) (García *et al.*, 2019). De acuerdo con diversos estudios (Charlier *et al.*, 2009), estas parasitosis disminuyen la ganancia diaria de peso, la producción láctea y afectan la reproducción, conllevando a graves pérdidas económicas (Borges *et al.*, 2012; Charlier *et al.*, 2015, Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017; Villa-Mancera y Reynoso, 2019). Entre los NGI que más afectan al ganado bovino se encuentran los géneros: *Haemonchus spp.*, *Cooperia spp.*, *Trichostrongylus spp.*, *Oesophagostomun spp.*, y *Ostertagia spp.* (Torres *et al.*, 2007; Encalada-Mena *et al.*, 2009; Quiroz *et al.*, 2009; Steffan *et al.*, 2012; Alonso-Díaz *et al.*, 2015). Sin embargo, el género de *Cooperia spp.*, ha sido reportado como uno de los parásitos con mayor prevalencia a nivel mundial. Asimismo, *Cooperia punctata* se ha clasificado como la especie de NGI con mayor patogenicidad y prevalencia en las regiones tropicales (Fabiyyi *et al.*, 1988; Lima, 1998; Encalada-Mena *et al.*, 2008; Gasbarre *et al.*, 2009b; Ramünke *et al.*, 2018). Stromberg *et al* (2012) reportan los efectos adversos que ejerce C.

punctata sobre el ganado bovino; destacando una disminución del consumo voluntario y de la ganancia diaria de peso (GDP).

Tradicionalmente, la base para el control parasitario ha sido la administración continua de antihelmínticos pertenecientes a tres grupos quimioterapéuticos: benzimidazoles, imidazotiazoles y lactonas macrocíclicas (Cardoso *et al.*, 2013; Buss *et al.*, 2018; Charlier *et al.*, 2018). Sin embargo, la mala utilización (dosificación sin pesaje, tratamiento no dirigido, frecuencia entre aplicaciones, falta de rotación entre familias químicas y uso frecuente de principios activos de larga acción) ha favorecido la emergencia de resistencia antihelmíntica (RA); dificultando así el control parasitario (Torres *et al.*, 2007; Gasbarre, 2014; Becerra-Nava *et al.*, 2014; Alonso-Díaz *et al.*, 2015; Muñoz *et al.*, 2015; Lanusse *et al.*, 2018).

Debido a esta problemática se han desarrollado diversas líneas de investigación orientadas a la búsqueda de alternativas que permitan mantener las poblaciones parasitarias a niveles compatibles con la producción animal. Como el uso de plantas bioactivas y fitoquímicos, que han sido una de las líneas más investigadas en las últimas décadas; y se ha reportado que los compuestos polifenólicos (CPf's) representan uno de los grupos de metabolitos secundarios de las plantas (MSP) con mayor actividad antihelmíntica (AH) (Sandoval-Castro *et al.*, 2012; Hoste *et al.*, 2012; von Son-de Fernex *et al.*, 2015; Klongsiriwet *et al.*, 2015; Desrues *et al.*, 2016; Castillo-Mitre *et al.*, 2017).

Particularmente, un estudio logró el aislamiento e identificación de diversos CPf's (ácido cafeico, cumarina, escopoletina, quercetina y rutina) y reportó su actividad AH contra huevos y larvas del NGL *C. punctata* (von Son-de Fernex *et al.*, 2015). Así mismo, otro estudio reciente evaluó la combinación de estas moléculas y su efecto contra fases de vida libre (huevo y larva infectante) de *C. punctata* (Escareño-Díaz *et al.*, 2019). Dicha evaluación permitió la clasificación de los compuestos como moléculas bioactivas y moléculas potencializadoras de bioactividad y reportó que las combinaciones cumarina:quercetina y ácido

cafeico:rutina, en una proporción 8:2, tienen la capacidad de inhibir tanto la eclosión de huevos como el desarrollo larvario de *C. punctata*. No obstante, se desconoce si dichas combinaciones tienen la capacidad de afectar la motilidad de larvas infectantes (L₃) y la fase adulta del parásito; así como su posible mecanismo de acción. Por ello, los objetivos de este trabajo de investigación fueron: determinar el efecto AH *in vitro* de las combinaciones de los CPf's cumarina:quercetina y ácido cafeico:rutina contra L₃ y parásitos adultos de *C. punctata* y evaluar las posibles alteraciones morfológicas provocadas en estos parásitos post-tratamiento.

III. REVISIÓN DE LITERATURA.

3.1. Ganadería bovina de doble propósito en México.

En México la ganadería bovina de doble propósito cobra especial importancia, ya que más del 60 % de los productores del país mantienen sus UPB bajo este sistema (Vilaboa *et al.*, 2009). Dicho sistema se caracteriza por tener dos fines zootécnicos: producción de leche (que se utiliza principalmente para elaboración artesanal de derivados lácteos en un 70 %) y carne (venta de becerros); aportando el 20 % y el 40 % de la producción nacional anual de leche y carne, respectivamente (Urdaneta, 2009; Luna *et al.*, 2018). Este sistema de producción se desarrolla principalmente en las áreas tropicales del país, las cuales abarcan aproximadamente el 25 % del territorio nacional (Magaña *et al.*, 2006). Región en la cual se distribuye alrededor del 80 % de las UPB del país (Vilaboa *et al.*, 2009), donde 2.8 millones de cabezas de ganado se encuentran bajo un sistema de pastoreo extensivo y su alimentación se basa en el consumo de gramíneas y leguminosas, nativas o introducidas (Vilaboa y Díaz, 2009; Jarillo *et al.*, 2010; Martínez-Castro *et al.*, 2012; ENA, 2017). A consecuencia de lo anterior, algunos de los principales problemas que enfrentan dichas UPB son las deficiencias nutricionales, asociado a manejos inadecuados de los pastos (disponibilidad y calidad), y las enfermedades parasitarias (ectoparásitos y endoparásitos) (Corro *et al.*, 1999; Rojo *et al.*, 2009; Borges *et al.*, 2012). Dentro de las últimas, las nematodosis gastrointestinales han sido clasificadas como uno de los principales problemas de salud animal que enfrentan estas UPB (Lanusse *et al.*, 2018), debido a que la fase que infecta al ganado se encuentra en las pasturas (Canul-Ku *et al.*, 2012; Fiel *et al.*, 2012).

3.2. Generalidades de los nematodos gastrointestinales.

Los nematodos gastrointestinales (NGI) poseen una conformación anatómica cilíndrica, alargada y no segmentada. Sus dimensiones varían entre los diferentes géneros y presentan dimorfismo sexual, los machos siempre suelen ser más pequeños que las hembras (Cordero, 2007; Bowman, 2014). La estructura de los NGI se compone de: cutícula, músculo, sistema nervioso, digestivo, reproductivo y excretor (Figura 1). Estos organismos no presentan sistema respiratorio, ni circulatorio (Quiroz, 2005).

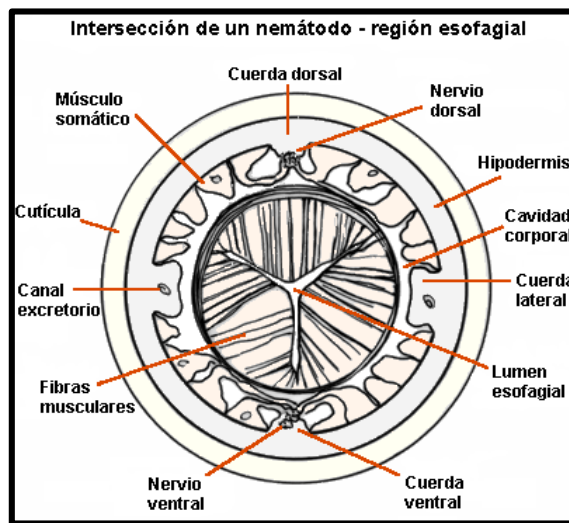


Figura 1. Sección transversal de un nematodo a nivel de esófago (Jhonstone, 1998).

La cutícula es acelular, ya que es una estructura secretada por las células de la hipodermis, de color transparente y compuesta por proteínas como la albúmina, matricina, colágeno, queratina y glicoproteínas, esta estructura los hace resistente a la digestión intestinal (Quiroz, 2005; Taylor, 2016). La hipodermis es una capa delgada que da origen a cuatro cordones gruesos: dos cordones laterales (canales excretores), un cordón dorsal y uno ventral (sistema nervioso) (Taylor, 2016).

El sistema muscular está compuesto por dos tipos de músculos:

1) Músculo especializado: lo conforman los músculos del esófago, del intestino delgado, dilatadores y compresores del ano y los copuladores de la hembra (vulvares) y el macho (los de la bolsa copulatriz, espiculares y del gubernáculo) (Quiroz, 2005).

2) Músculo no especializado o somático: contribuye a la locomoción rápida por la contracción y relajación de la parte dorsal y ventral del cuerpo debido a las ondulaciones sinusoidales de sus fibras musculares, que se encuentran dispuestas longitudinalmente (Bowman, 2014).

En la cavidad pseudocelómica (corporal) se encuentran, a alta presión, fluidos que recubren los órganos y le dan turgencia y forma al cuerpo de estos (Bowman, 2014).

Poseen un sistema digestivo completo, comienza con la cápsula bucal y continua con el esófago (Quiroz, 1996), después se encuentra el intestino, el cual se conforma por una sola capa celular que termina en el ano, en caso de las hembras, o cloaca, en caso de los machos (Taylor, 2016).

El aparato reproductor presenta diferencias morfológicas entre hembras y machos (dimorfismo sexual); las hembras generalmente tienen un par de ovarios, oviducto y doble útero, el cual termina en la vagina y se conecta con la vulva. Los machos poseen uno o dos testículos, un vaso deferente, una vesícula seminal y un conducto eyaculador que se comunica con la cloaca (Bowman, 2014; Taylor, 2016) (Figura 2).

Así mismo, los NGI cuentan con un sistema excretor (considerado primitivo) que se encuentra conformado por un conducto que corre a lo largo de cada uno de los cordones laterales; desembocando en un poro excretor ubicado en la región del esófago (Taylor, 2016) y tiene función osmorreguladora (Quiroz, 2005).

El sistema nervioso está conformado por cuatro ganglios: dos laterales, uno ventral y uno caudal.

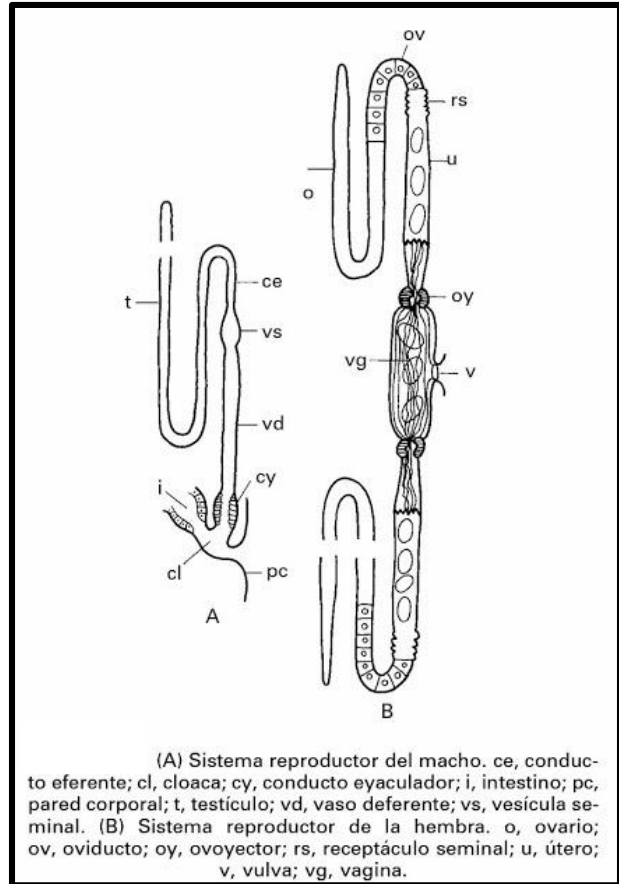


Figura 2. Sistema reproductor del macho y la hembra de nematodos (Cordero, 2007).

3.2.1. Ciclo biológico de los NGI.

La mayoría de los NGI pertenece a la familia *Trichostrongylidae*, la cual presenta un ciclo directo, es decir, no necesitan de un huésped intermediario para completar su ciclo de vida (Charlier *et al.*, 2020). Este se divide en dos etapas, una que se desarrolla dentro del hospedero (fase parasítica o fase endógena) y otra que se lleva a cabo en el ambiente (fase pre-parasítica o fase exógena) (Figura 3).

La fase pre-parasítica comienza con la expulsión de los huevos a través de las heces. Los huevos se encuentran conformados por una capa compuesta de tres membranas: interna (delgada, impermeable y lipídica), intermedia (dura y quitinosa)

y externa (hecha de proteínas). Una vez expulsado, el huevo continúa el desarrollo embrionario en un lapso de tres horas (von Son-de Fernex, 2016). Cuando se forma la larva 1 (L₁) se da paso a la eclosión, la L₁ absorbe el agua del ambiente, crece y junto con sus movimientos provocan la fractura del huevo.

Posterior a la eclosión, ocurren dos mudas para convertirse en la fase que infecta al animal. La L₁ realiza una muda para convertirse en larva 2 (L₂), la cual se alimenta de las bacterias presentes en las heces y, posteriormente, se presenta una segunda muda para dar origen a la larva 3 o larva infectante (L₃). La L₃ se caracteriza por presentar retención cuticular de la fase biológica previa, la cual tiene alto contenido de cuticlina, una proteína que le confiere mayor protección al estrés medioambiental (Fetterer y Rhoads, 1993), durante el periodo en el cual se mantendrá en los pastos hasta ser ingerida por el animal. En dicha fase, las L₃ no se alimentan, sobreviven debido a las reservas lipídicas almacenadas en el intestino y que fueron adquiridas durante las fases previas.

La tasa de supervivencia de la L₃ en los pastos varía según las condiciones climáticas pero por lo general su vida media es de uno a tres meses en climas tropicales y subtropicales (Torres-Acosta y Hoste, 2008). Una vez dentro del huésped, la L₃ debe llevar a cabo el proceso de desenvainamiento larvario para adquirir su capacidad infectante; dicho proceso se lleva a cabo en la sección del tracto digestivo previo a su sitio de establecimiento. Una vez desenvainada, y en su sitio de establecimiento, la L₃ continuará con su desarrollo, convirtiéndose en larva 4 (L₄). Posteriormente, a las dos o tres semanas pasan a ser adultos inmaduros y tras alcanzar la madurez sexual inicia el proceso de copulación para que la hembra pueda iniciar con la producción de huevos; los cuales serán expulsados al medio ambiente junto con las heces, dando así perpetuidad a su ciclo biológico.

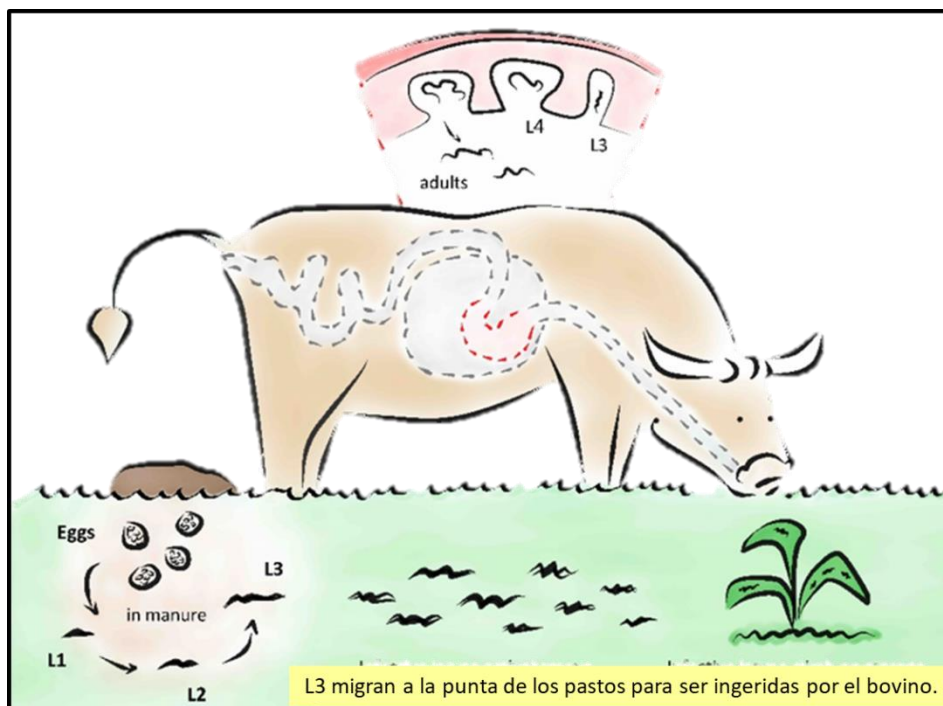


Figura 3. Ciclo de vida de los NGL.

3.2.2. *Cooperia punctata*.

C. punctata fue descubierta por Ranstow en 1907 y es considerada la especie más patógena entre las cooperias (*C. oncophora*, *C. pectinata* y *C. curticei*). Las hembras de esta especie miden alrededor de 6-9 mm de largo y los machos de 4.5-6 mm. La cavidad cefálica es pequeña, en la región esofágica tienen estriaciones cuticulares transversales y en el cuerpo crestas longitudinales. Las espículas de los machos son cortas y cóncavas en el centro, de color café, terminan en punta roma y tiene una proyección lateral estrecha, la bursa es más grande en comparación con el cuerpo, su rayo dorsal tiene ramas bifurcadas en forma de “U” y poseen una pequeña rama que se dobla hacia ventral, lateralmente, y carece de gubernáculo (Gibbons *et al.*, 1981; Lukovich, 2011; Bowman, 2014; Ramünke *et al.*, 2018) (Figura 4). La cola de las hembras es larga, en forma de cono y tiene una lengüeta vulvar. Su sitio de establecimiento dentro del huésped es el intestino delgado, sin embargo, se ha reportado su presencia en abomaso (Chollet *et al.*, 2000; Gasbarre *et al.*, 2009). Su ciclo biológico es similar al descrito para la familia



Figura 4. Aparato reproductor de un macho de *Cooperia punctata*.

de los *Trichostrongylidae*. El desenvaine ocurre después de haber entrado al huésped y, una vez ocurrido este evento, penetra las células del intestino delgado, a los cuatro días surge de la mucosa intestinal como L4, luego pasan de 9 a 11 días, aproximadamente, para transformarse en adulto y con la ovoposición de las hembras presenta así un periodo pre-patente de aproximadamente 13 días y una patencia que alcanza hasta los 9 a 15 meses.

3.3. Impacto de las nematodosis gastrointestinales en la producción bovina.

Los NGI son parásitos internos que se encuentran en el tracto gastrointestinal (TGI) de los bovinos y afectan mayormente la productividad durante época de lluvias en climas tropicales (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017). Regiones en donde su prevalencia es mayor que en otro tipo de climas (Villa-Mancera *et al.*, 2019). Las infecciones por NGI se caracterizan por ser de naturaleza mixta, donde se pueden encontrar hasta ocho géneros causando diversas lesiones (Cuadro 1) a lo largo del TGI del hospedero y desencadenar una variedad de trastornos (metabólicos, nutricionales, digestivos e inmunológicos) (Angulo-Cubillán, 2005; Steffan *et al.*, 2012), afectando así las funciones biológicas de los animales; lo cual se traduce en una disminución de los parámetros productivos y en su desarrollo (Charlier *et al.*, 2014; Charlier *et al.*; 2017; Villa-Mancera y Reynoso, 2019). Algunos de los signos más comunes de las nematodosis son: diarrea, anorexia, letargia, emaciación

progresiva, pelo hirsuto, disminución de la condición corporal (pérdida de peso), distensión abdominal, deshidratación, mucosas pálidas, edemas, aumento de la frecuencia cardíaca y de la respiratoria (Dimander, 2003; Angulo-Cubillán, 2005; Taylor *et al.*, 2014). El efecto de las nematodosis sobre la salud y el desempeño animal varía según el género parasitario involucrado en la infección; no obstante, ha sido asociado a los procesos de establecimiento y permanencia parasitaria y debido a su acción patógena (mecánica, expoliadora y/o irritativa) sobre la mucosa gástrica e intestinal alteran el metabolismo de las proteínas, minerales y la energía (von Son-de Fernex, 2016).

Se ha reportado que las infecciones por NGI en los primeros dos años de vida, en los bovinos, tiene un impacto negativo que afecta de manera general toda la cadena productiva; prolongando la permanencia de los animales en la diferentes etapas productivas y con ello un incremento en los tiempos de nacimiento a primer servicio, primer parto y primer lactancia (Charlier *et al.*, 2014). Las infecciones subclínicas por NGI pueden generar pérdidas de hasta 20-30 kg por animal en un periodo de seis a ocho meses y de hasta 40-50 kg tratándose de parasitosis clínica (Fiel y Steffan, 2016). Así mismo, diversos autores mencionan que las infecciones por NGI en ganado adulto puede afectar la producción láctea (Charlier *et al.* 2009; Perri *et al.*, 2011) con pérdidas productivas que van desde 1.37 hasta 1.78 kg leche/vaca/día y económicas, que van de \$ 5,541.49 a \$ 6,982.50 dólares por año en México (Villa-Mancera y Reynoso, 2019).

En el caso de *C. punctata*, un estudio reportó que la infección monoespecífica en becerros provocó una disminución de 680 gr MS/día en el consumo voluntario y una disminución de 0.11 kg/día en la GDP. Así mismo, se ha reportado que puede generar un efecto negativo sobre el metabolismo del fósforo, alterando su absorción y retención (Louvandini *et al.*, 2009; Stromberg *et al.*, 2012); lo que se traduce a un pobre desarrollo óseo (Fiel y Steffan., 2016). Además, al penetrar la mucosa del intestino delgado provoca una enteritis catarral, hipoproteinemia y edema submandibular (Ramünke *et al.*, 2018).

Un estudio reciente estimó que en México las nematodosis gastrointestinales generan pérdidas que alcanzan los \$ 445.10 millones de dólares por año, debido a una disminución del desempeño productivo de animales no tratados; y sin considerar los costos generados por el tratamiento AH en animales, los cuales alcanzan los \$ 4.02 y \$ 3.99 dólares anuales por animal joven y adulto, respectivamente (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017; Villa-Mancera y Reynoso, 2019). Tomando en cuenta todo el impacto generado en la salud y productividad de los animales se debe optar por mejores métodos y nuevas alternativas de control que disminuyan el impacto económico de las nematodosis (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017).

Cuadro 1. Géneros de nematodos más comunes que afectan el ganado bovino en el trópico (Angulo-Cubillán, 2005; Steffan *et al.*, 2012).

Género	Vía de entrada al hospedero	Ubicación en el TGI	Daños/acción
<i>Cooperia spp.</i>	Oral	Intestino delgado	Alteraciones en el ciclo del fósforo y menor absorción de alimento seco
<i>Haemonchus spp.</i>	Oral	Abomaso	Dstrucción de tejido Infiltración celular Petequias/Hematófago
<i>Mecistocirrus spp.</i>	Oral	Abomaso	Dstrucción de tejido Infiltración celular Petequias/Hematófago
<i>Nematodirus spp.</i>	Oral	Intestino delgado	Interfieren la absorción
<i>Oesophagostomum spp.</i>	Oral	Intestino grueso	Nódulos en intestino delgado

<i>Ostertagia spp.</i>	Oral	Abomaso	Formaciones nodulares umbilicadas/ Hematófaga
<i>Trichostrongylus spp.</i>	Oral	Abomaso e intestino delgado	Alteraciones en procesos digestivos

3.4. Alternativas para el control de nematodos gastrointestinales.

Se consideran alternativas a todas las estrategias para controlar las infecciones provocadas por NGI. Dichas estrategias han sido clasificadas con base en la fase parasitaria en la cual ejercen su acción, como: control de supra-poblaciones (fases parasitarias de vida libre) e infra-poblaciones (fases parasitarias que se encuentran dentro del hospedero). Las primeras incluyen el manejo de potreros y control biológico; y las segundas, el uso de fármacos, inmunología y el uso de plantas bioactivas (Jackson y Miller, 2006). Siendo el uso de plantas bioactivas, y sus metabolitos secundarios, una de las alternativas de control más estudiadas en la última década, debido al potencial que representan para el desarrollo de nuevos fármacos (Akhtar *et al.*, 2000; Hoste *et al.*, 2008; Lanusse *et al.*, 2018). Aunque el método químico ha sido el más utilizado en el mundo, por su facilidad de uso, económico y amplio espectro contra los NGI (Jackson y Miller, 2006).

3.4.1. Control químico.

Este método de control consiste en el uso de antihelmínticos como: benzimidazoles, imidazotiazoles, lactonas macrocíclicas, tetrahidropirimidinas y derivados del aminoacetónitrilo (Cuadro 2). Los cuales, dependiendo de su naturaleza química, tienen diferentes mecanismos de acción.

Cuadro 2. Familias antihelmínticas, sus principales moléculas comerciales, mecanismo de acción y espectro (Márquez *et al.*, 2003; Gasser *et al.*, 2016; Besier *et al.*, 2016).

Familia química	Moléculas	Mecanismo de acción	Espectro
Benzimidazoles	Tiabendazol	Inhibición de la polimerización de los microtúbulos por unión a la beta-tubulina	Amplio
	Albendazol		
	Mebendazol		
	Oxfendazol		
Imidazotiazoles	Levamisol	Agonistas colinérgicos	Amplio
	Tetramisol		
Lactonas macrocíclicas	Ivermectina	Mantienen los canales de cloro abiertos, interfiriendo con la transmisión nerviosa.	Amplio
	Abamectina		
	Doramectina		
	Milbemicina		
Tetrahidropirimidinas	Morantel	Agonistas nicotínicos contra receptores de acetilcolina	Amplio
	Pirantel		
Derivados del amino-acetonitrílicos	Monopantel	Inhibe los receptores nicotínicos de acetilcolina	Corto

Para el control de NGI por medio de químicos cabe destacar que, para lograr el efecto AH, es importante que el fármaco entre a concentraciones suficientes al sitio de acción del helminto. Además, la afluencia entre la cantidad del fármaco en el sitio de acción, la facultad del parásito para inactivar el fármaco y la salida del mismo (por medio de proteínas transportadoras) lograrán la concentración suficiente en el sitio de acción del parásito para ejercer la acción AH. Aunque, la eficacia y/o persistencia del fármaco dependerá del tiempo de exposición del parásito a las concentraciones activas de la droga. Todas estas consideraciones establecerán el efecto AH final (Lanusse *et al.*, 2018).

3.5. Resistencia antihelmíntica.

La resistencia se define como “la detección, por medio de pruebas sensitivas, de un aumento significativo de individuos dentro de una misma especie y población de parásitos capaces de tolerar dosis de droga (S) que han probado ser letales para la mayoría de individuos de la misma especie” (Nari y Hansen, 1999).

La resistencia puede presentarse en dos formas: intrínseca y adquirida. La primera se refiere a un parásito con menor sensibilidad o tolerancia innata a una droga por falta de receptores o imposibilidad de la droga para entrar a la célula. Por otro lado, la resistencia adquirida hace referencia a los NGI que originalmente son sensibles al efecto AH y después de modificaciones genéticas (que son heredables en cada generación) dejan de serlo (Torres *et al.*, 2007). Este proceso de resistencia se ha desarrollado hacia las principales familias AH (Cuadro 3).

La continua emergencia de RA puede asociarse a la indiscriminada utilización de moléculas químicas, así como a su uso inadecuado. Algunos de los factores externos que favorecen a su uso indiscriminado y a la aparición de RA son: su amplio espectro, los precios accesibles y su fácil administración (Gasser *et al.*, 2016; Lanusse *et al.*, 2018). Por lo tanto, la eficacia y viabilidad del uso de fármacos

para su control se ven amenazadas con el aumento de poblaciones de NGI resistentes y tan solo por este hecho la productividad y la salud de los animales también se ven afectadas. Actualmente se ha reportado la presencia de cepas de NGI con RA, como el caso de *C. punctata*, a los diversos fármacos disponibles en el mercado (Encalada-Mena *et al.*, 2008; Gasbarre *et al.*, 2009a; Gasbarre *et al.*, 2009b; Stromberg *et al.*, 2012; Canul-Ku *et al.*, 2012; Becerra-Nava *et al.*, 2014; Alonso *et al.*, 2015).

Como consecuencia a la RA, actualmente el desafío científico se centra en el desarrollo de nuevas formulaciones antihelmínticas que permitan tanto controlar las infecciones parasitarias a niveles compatibles con la producción animal como prolongar la vida útil de las moléculas ya existentes (Lanusse *et al.*, 2018).

Cuadro 3. Mecanismos de resistencia a las principales familias químicas (Mayoral-Peña *et al.*, 2017).

Familia farmacológica	Mecanismo de resistencia
Benzimidazoles	Mutación de los genes que codifican para beta tubulina.
Imidazotiazoles/ Tetrahidropirimidinas	Cambios y alteraciones en los receptores nicotínicos a los que se unen estos fármacos.
Lactonas macrocíclicas	Podría estar asociada a modificaciones en los receptores GluCl a los que se unen o por sobreexpresión de gp-P.

3.6. Compuestos polifenólicos.

Los compuestos polifenólicos (CPf's) son metabolitos secundarios de las plantas (MSP). Existen alrededor de 8,000 CPf's identificados, los cuales son sintetizados por las vacuolas de las plantas durante la síntesis de aminoácidos aromáticos a partir de la ruta del ácido shikimico y su función dentro de la planta incluye: mecanismo de defensa ante agentes biológicos, químicos, estrés climático, adaptación ambiental y/o para la reparación de tejido celular (Quiñonez *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2018). Se caracterizan por poseer una estructura molecular de tres anillos (dos aromáticos y un heterocíclico) y cuya posición, en el arreglo molecular, determinará su actividad biológica (Wojdylo *et al.*, 2007; Waghorn, 2008). Los CPf's con mayor actividad antihelmíntica reportada se pueden clasificar en tres grupos: 1) ácidos fenólicos, 2) flavonoides y 3) taninos (Mercado-Mercado *et al.*, 2013).

Una de las propiedades de los CPf's que ha sido principalmente asociada a su actividad antihelmíntica es su capacidad de precipitación proteica e interacción con las proteínas estructurales de los nematodos (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2018); reportándose que dicha interacción tiene la capacidad de afectar diferentes fases del ciclo biológico de los NGI, como: la eclosión y/o desarrollo embrionario, desarrollo, desenvaine y motilidad de la L₃, alimentación, reproducción y motilidad de parásitos adultos (Azando *et al.*, 2011; von Son de Fernex *et al.*, 2015; Mayoral *et al.*, 2017; von Son-de Fernex *et al.*, 2017; Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2018; Escareño-Díaz *et al.*, 2019).

3.6.1. Ácido cafeico.

Es un ácido fenólico con dos grupos fenol y un grupo carboxilo ($\text{CH} = \text{CHCOOH}$) (Figura 5). El ácido caféico es uno de los ácidos fenólicos con mayor distribución en la naturaleza y posee notables propiedades antioxidantes (Magnani *et al.*, 2019; İlyasoğlu *et al.*, 2019).

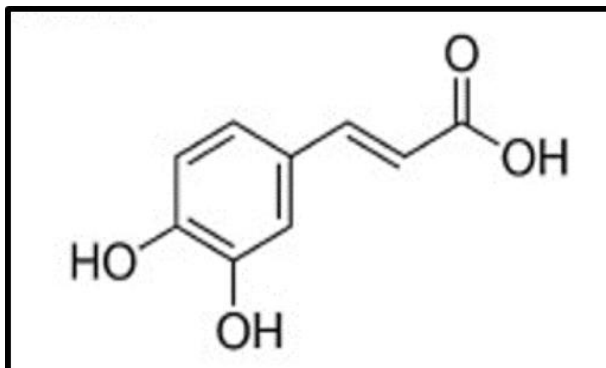


Figura 5. Estructura química del ácido cafeico.

Estudios *in vitro* han reportado que dicha molécula tiene la capacidad de inhibir la eclosión de huevos de *C. punctata* (von Son-de Fernex *et al.*, 2015) y actividad ovicida contra *H. contortus* (Castillo-Mitre *et al.*, 2017). También, estudios recientes reportan una actividad sinérgica entre el ácido cafeico y compuestos polifenólicos como la quercetina, rutina, quercetina y escopoletina, contra la inhibición de la eclosión de huevos y el desvaine de la L₃ de *C. punctata* (Escareño-Díaz *et al.*, 2019).

3.6.2. Cumarina.

La cumarina (2H-1-chromen-2-ona) (Figura 6) es un compuesto químico perteneciente a la clase de las benzopironas, estas se encuentran en diversas plantas, frutas y vegetales (Poumale *et al.*, 2013; Venugopala *et al.*, 2013). Se le han atribuido actividades biológicas como: antiinflamatoria, anticoagulante,

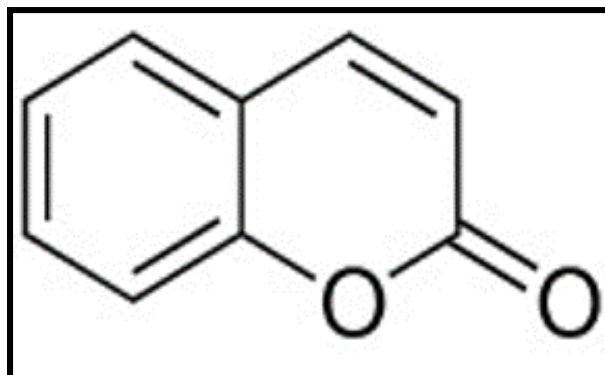


Figura 6. Estructura química de la cumarina (Tavares da Silva, 2019).

antibacteriana, antifúngica, antiviral, anticancerígena, antidiabética, antihipertensiva, antitubercular, anticonvulsiva, antiadipogénica, antihiper glucémica, antioxidante, neuroprotectora, inhibidora de enzimas y antihelmíntica (Poumale *et al.*, 2013; Venugopala *et al.*, 2013; Escareño-Díaz *et al.*, 2019; von Son-de Fernex *et al.*, 2017; Tavares da-Silva *et al.*, 2019; Menezes *et al.*, 2019). Guang-Lu *et al* (2016) reportaron la actividad AH de un derivado de la cumarina contra el monogeneo de peces *Dactylogyrus intermedius*. Así mismo, un estudio reciente reportó una actividad AH sinérgica contra las fases de vida libre de *C. punctata*, donde al combinar dicha molécula con quercetina se observó una reducción de la concentración efectiva media (CE₅₀) hasta en un 60% (Escareño-Díaz *et al.*, 2019).

3.6.3. Quercetina.

Flavonoide (Figura 7) encontrado en diferentes plantas y clasificado como el antioxidante más potente de los polifenoles y en diversos estudios se ha reportado su actividad antiinflamatoria, antiproliferativa, antiangiogénica, hepatoprotectora, anti envejecimiento, antiviral y antibacteriana (Materska, 2008; Guzansky *et al.*, 2019). No obstante, en otros estudios se ha demostrado su actividad AH contra varios géneros parasitarios como: el fitonematodo *Meloidogyne incognita* (Adekunle

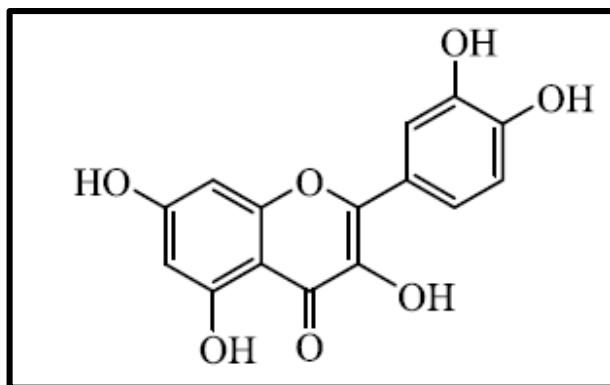


Figura 7. Estructura química de la quercetina (Tian *et al.*, 2019).

y Aderogba, 2008); *H. contortus* (Mengistu *et al.*, 2017) y *Fasciola hepática* (Pereira *et al.*, 2016). También, se ha reportado actividad de un derivado de la quercetina contra la motilidad y viabilidad de la L₃ de *Trichostrongylus spp.*, (Kozan *et al.*, 2013).

Así mismo, a la quercetina se le han atribuido propiedades sinérgicas o potencializadoras al ser combinadas con diversas moléculas como la moxidectina, ivermectina, cumarina, taninos y ácido cafeico (Dupuy *et al.*, 2003; Heckler *et al.*, 2014; von Son-de Fernex *et al.*, 2015; Klongsiriwet *et al.*, 2015; Escareño-Díaz *et al.*, 2019). Dicha actividad, ha sido asociada a su capacidad para inhibir las proteínas de membrana celular conocidas como glicoproteínas P (gp-P); las cuales se encargan de transportar y mediar la salida de sustancias xenobióticas dentro de las células de los parásitos (Lespine *et al.*, 2012).

3.6.4. Rutina.

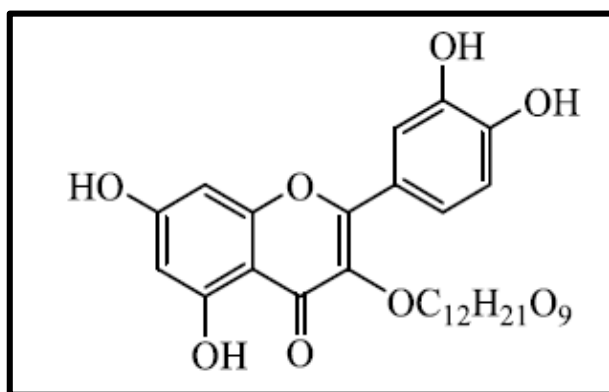


Figura 8. Estructura química de la rutina (Tian *et al.*, 2019).

Es un glucósido flavonoide (Figura 8) encontrado en muchas plantas y con potente actividad antihelmíntica, antimicrobiana, larvicida y citotóxica (NIH; Dubey *et al.*, 2019). Se ha reportado que la rutina ejerce una acción directa contra: *H. contortus*, *Giardia lamblia*, *Ascaridia galli*, las larvas de mosquito

S. aegypti y *C. punctata* (Barrau *et al.*, 2005; Alday-Provencio *et al.*, 2015; Dubey *et al.*, 2019; Escareño *et al.*, 2019). También, se ha reportado que dicho flavonoide, al igual que la quercetina, posee actividad sinérgica y/o potencializadora contra la eclosión de huevos y el desenvaine larvario de *C. punctata*; reduciendo la CE₅₀ del ácido cafeico en más de un 80 % (Escareño-Díaz *et al.*, 2019).

3.7. Herramientas para determinar el mecanismo de acción de moléculas con potencial antihelmíntico.

La validación científica de extractos de plantas o MSP con potencial AH contra NGI de rumiantes se ha basado en la utilización de pruebas *in vitro*, a través de la estandarización de bioensayos, como: i) Inhibición de la Eclosión de Huevos (IEH), ii) Inhibición del Desarrollo Larvario (IDL), iii) Inhibición del Desvaine Larvario (IDL), iv) Inhibición de la Alimentación Larvaria (IAL), v) Inhibición de la Migración Larvaria (IML) e vi) Inhibición de la Motilidad del Adulto (IMA) (Jackson y Hoste, 2010). La estandarización y utilización de dichas pruebas permite realizar estudios para el descubrimiento de nuevos medicamentos, con un menor costo de inversión y una elevada reproducibilidad (Githiori *et al.*, 2006; Hoste *et al.*, 2008; Sandoval-Castro *et al.*, 2012). Así mismo, permiten la evaluación de moléculas con potencial antihelmíntico sobre diferentes fases del ciclo biológico (huevo, larva y adulto) de los NGI, con la finalidad de identificar su efecto sobre procesos específicos del ciclo biológico y determinar las concentraciones efectivas medias (Hoste *et al.*, 2008; Mayoral-Peña *et al.*, 2017).

No obstante, el uso de bioensayos no permite realizar un planteamiento sobre el posible mecanismo de acción, ni la identificación de estructuras o biomoléculas objetivo del efecto encontrado. La importancia de establecer el mecanismo de acción radica en que, la identificación de las moléculas activas y los receptores o biomoléculas con las cuales interactúan, ha sido considerado un prerequisite para la utilización de productos naturales de las plantas como medicamentos (Behnke *et al.*, 2008), debido a que permite asegurar una consistencia del efecto AH, determinar la existencia de una toxicidad específica, considerar posibles efectos secundarios e inclusive para mejorar o potencializar su acción y evitar mecanismos ante los cuales ya existe RA y, finalmente, determinar la drogabilidad del mismo.

Cuando se tiene conocimiento de la estructura molecular del componente activo, y su efecto, el mecanismo de acción puede determinarse a través de estudios

específicos, como la electrofisiología y neurofarmacología; los cuales permiten determinar el efecto de fármacos sobre los parásitos, como: i) inhibición enzimática, ii) activación o bloqueo de receptores, neurotransmisores y canales iónicos, iii) unión al ADN y iv) unión a otras proteínas y estructuras.

Cuando se desconoce el efecto de una molécula su mecanismo de acción puede ser propuesto a través de técnicas de imagen como la MEB y MET; las cuales permiten evaluar el efecto de nuevos fármacos sobre la estructura y ultraestructura de agentes patógenos (Wenzel *et al.*, 2019).

3.7.1. Microscopía electrónica de barrido y de transmisión.

La microscopía electrónica es una herramienta diseñada por Ernst Ruska y Max Knoll en 1931. El principio de dichas microscopías es la generación de una imagen tridimensional (3D) de la superficie de un espécimen o bidimensional (2D) de su interior, utilizando la microscopía electrónica de barrido (MEB) o la microscopía electrónica de transmisión (MET), respectivamente (Chong y Deng, 2012; Raghavendra y Pullaiah, 2018). La imagen tridimensional que proporciona la MEB es generada a partir de la incidencia de un haz de electrones sobre la superficie de un objeto en estudio (Webb y Holgate, 2003; Anderson, 2019). Por otro lado, la MET utiliza un haz de electrones pero de alto voltaje, lo que le da la capacidad a los electrones de atravesar una muestra de hasta un micrómetro de grosor y emitir imágenes de estructuras muy pequeñas (100 nm) (Bradbury y Joy, 2019; Saksena *et al.*, 2019). Las interacciones, entre los electrones y los átomos que provoca dicho haz, crean una imagen transmitida en 2D en la que se pueden observar características ultraestructurales como la bicapa fosfolípida de las membranas celulares (Chong y Deng, 2012); la resolución con la que se puede observar en este tipo de microscopio es 1000 veces mayor que la del microscopio compuesto. Por lo tanto, MEB permite la observación de varias muestras a la vez,

mientras que en MET solo se puede observar una a la vez (Tang y Yang, 2017; Saksena *et al.*, 2019).

La MEB y la MET son tecnologías que sirven como herramienta para el área científica. Estudios recientes, la han utilizado para observar los daños estructurales y ultraestructurales generados a parásitos de rumiantes, que fueron incubados en taninos y extractos de plantas, permitiendo proponer los posibles mecanismos de acción AH (Brunet *et al.*, 2011; von Son-de Fernex *et al.*, 2015; von Son-de Fernex *et al.*, 2017; Martínez Ortiz-de Montellano *et al.*, 2019).

IV. HIPÓTESIS.

- Las combinaciones cumarina:quercetina y ácido cafeico:rutina afectarán la motilidad tanto de L₃ como de parásitos adultos de *Cooperia punctata*.
- Las combinaciones cumarina:quercetina y ácido cafeico:rutina causarán daños estructurales y ultraestructurales en L₃ y parásitos adultos de *Cooperia punctata*.

V. OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto *in vitro* de la combinación de compuestos polifenólicos sobre la motilidad de L₃ y parásitos adultos de *Cooperia punctata*; así como, las posibles alteraciones estructurales y ultraestructurales generadas en su morfología.

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Evaluar el efecto de la combinación de cumarina y quercetina (8:2) sobre la motilidad de L₃ y adultos de *Cooperia punctata*.
- Evaluar el efecto de la combinación de ácido cafeico y rutina (8:2) sobre la motilidad de L₃ y adultos de *Cooperia punctata*.
- Evaluar el efecto de las concentraciones efectivas medias de las combinaciones de compuestos polifenólicos (cumarina:quercetina y ácido cafeico:rutina) sobre la estructura y ultraestructura de L₃ y adultos de *Cooperia punctata*.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS:

7.1. Área de estudio.

El trabajo se realizó en el laboratorio de Sanidad Animal del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (CEIEGT-FMVZ), localizado en el km 5.5 de la carretera Federal Tlapacoyan-Martínez de la Torre, en el municipio de H. Tlapacoyan, Veracruz, México. Ubicado a una altitud de 112 msnm (Jarillo *et al.*, 2010) con clima cálido-húmedo, temperatura media anual de 23 °C y precipitación de 1900-3600 mm anuales (SEFIPLAN, 2016).

7.2. Compuestos polifenólicos (CPf's).

Los CPf's fueron adquiridos de los laboratorios Sigma® (St. Louis, MO): Cumarina (C₉H₆O₂), Quercetina (C₁₅H₁₀O₇•2H₂O), Ácido cafeico (HO₂C₆H₃CH=CHCO₂H), Rutina (C₂₇ H₃₀ O₁₆); con números de registro CAS (Chemical Abstracts Service) 117-39-5, 331-39-5, 153-18-4 y 91-64-5, respectivamente.

7.3. Material biológico.

Las L₃ y parásitos adultos fueron obtenidos de un donador monoespecífico infectado vía oral con una cepa pura de *Cooperia punctata* (84,400 L₃ / cepa C. p. CEIEGT-FMVZ-UNAM, Mexico). El becerro se mantuvo en confinamiento, con una cama de paja y suelo antiderrapante. Se alimentó con sustituto de leche (21 %PC), concentrado comercial (18 %PC), heno de *Brachiaria brizantha*, sales minerales y agua *ad libitum*. Cumpliendo con los lineamientos establecidos por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la FMVZ-UNAM (**Protocolo: #642**).

7.4. Técnicas parasitológicas.

7.4.1. Obtención de L₃.

Se colectaron heces directamente del recto del donador monoespecífico para la elaboración de coprocultivos; los cuales fueron incubados en una estufa de cultivo bacteriológico a 27 °C y 80 % HR durante siete días. Posteriormente, las L₃ fueron recuperadas mediante la técnica de Corticelli-Lai (Van Wik y Mayhew, 2013). Finalmente, se cuantificaron y colocaron en cajas de cultivo con agua destilada donde fueron almacenadas en refrigeración hasta su utilización (von Son-de Fernex *et al.*, 2012). Para los bioensayos se utilizaron L₃ de aproximadamente un mes de edad (Castañeda-Ramírez *et al.*, 2017).

7.4.2. Obtención de parásitos adultos.

Los parásitos adultos fueron recuperados del intestino delgado de un donador monoespecífico. El procedimiento de matanza se realizó con base en los estándares dictados por la Norma Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014 MÉTODOS PARA DAR MUERTE A LOS ANIMALES DOMÉSTICOS Y SILVESTRES y con la aceptación por parte del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de la FMVZ-UNAM (**Protocolo: #642**). Inmediato a la matanza, se realizó la necropsia para la recuperación de los primeros seis metros de intestino delgado; el cual fue ligado de ambos extremos y transportado en una hielera a temperatura ambiente al Laboratorio de Sanidad Animal del CEIEGT. El intestino fue seccionado y la mucosa fue colocada sobre un tamiz de 74 µm para favorecer la migración de los parásitos adultos hacia un contenedor con solución salina fisiológica (NaCl al 0.9 %, Pisa®) previamente calentada a 37 °C (Peña-Espinoza *et al.*, 2017).

7.5. Bioensayos.

7.5.1. Inhibición de la migración larvaria (IML).

El efecto de las combinaciones de los CPf's sobre la motilidad de larvas infectantes se realizó mediante la prueba de IML (Rabel *et al.*, 1994). Aproximadamente 1000 L₃ de *C. punctata* con vaina fueron incubadas por un periodo de tres horas a una concentración de 0.8 y 0.84 mg mL⁻¹ de cumarina:quercetina (8:2) y ácido cafeico:rutina (8:2), respectivamente. Se contó con un control negativo (etanol al 2.5 %; Heckler *et al.*, 2014) y un control positivo (Thiabendazole[®] 99 %). Posterior al tiempo de incubación, y con la finalidad de retirar los compuestos, las L₃ fueron lavadas y centrifugadas (2500 RPM) con agua destilada, el proceso se repitió tres veces. De inmediato, las L₃ fueron colocadas sobre mallas de nylon con una apertura de poro de 20 µm y se dejaron migrar por un periodo de tres horas a 27 °C (Rabel *et al.*, 1994). Después, se realizó el conteo directo (10 X) de L₃ que lograron atravesar la membrana. Se realizaron tres repeticiones para cada tratamiento y control. Para evaluar el efecto de las diferentes combinaciones, sobre la motilidad de L₃, el porcentaje de motilidad fue calculado de la siguiente manera: $Lm/Lt * 100$ (Donde Lm representa al total de L₃ que migraron a través de la malla y Lt al número total de L₃ depositadas sobre la misma) (von Son-de Fernex *et al.*, 2012). La motilidad fue corregida con un porcentaje de motilidad del grupo control mediante la siguiente fórmula: % de motilidad corregida (LMc)= $100-(100*(1-LmTx / LmC))$. Donde LmTx representa el porcentaje de motilidad larvaria por tratamiento y LmC el porcentaje de motilidad larvaria obtenida en el grupo control.

7.5.2. Inhibición de la motilidad del adulto (IMA).

Tras su recuperación, directamente del intestino, los parásitos adultos fueron colocados en cajas de Petri con solución salina fisiológica (NaCl al 0.9 %, Pisa[®]) a 37 °C, tanto para su lavado como para confirmar que los ejemplares no se

encontrarán muertos o dañados. Después, se colocaron de 10 a 13 ejemplares machos por pozo en una placa de cultivo celular de seis pozos. Posteriormente, se agregaron las combinaciones 8:2 de cumarina:quercetina y ácido cafeico:rutina a concentraciones decrecientes de: 0.8, 0.35, 0.175, 0.087, 0.43 y 0.022 mg mL⁻¹ y 0.84, 0.42, 0.21, 0.105, 0.052 y 0.026 mg mL⁻¹, para cada combinación respectivamente. Se contó con tres repeticiones por cada combinación y el control (etanol al 2.5 %). Las cajas con los diferentes tratamientos fueron colocados en una incubadora con inclusión del 5 % de dióxido de carbono (CO₂) (Incubadora de CO₂ Binder C-150®) y se evaluó la motilidad de los parásitos adultos con un microscopio invertido a las 6, 12 y 24 horas. Se registró el número de parásitos móviles e inmóviles (sin movimientos detectados durante 10 segundos) (Peña-Espinoza *et al.*, 2017). La motilidad de los adultos por tratamiento se calculó como: % de motilidad= 100 (número de parásitos adultos con motilidad por tratamiento/ número total de parásitos por tratamiento) (Peña-Espinoza *et al.*, 2017). La motilidad fue corregida con un porcentaje de motilidad del grupo control a través de la siguiente fórmula: % de motilidad corregida (AMc)= 100-(100*(1-AmTx / AmC)). Donde AmTx se refiere al porcentaje de motilidad de los parásitos adultos por tratamiento y AmC se refiere al porcentaje de motilidad de los parásitos adultos en el grupo control.

7.6. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y de Transmisión (MET).

Las larvas infectantes y parásitos adultos de *C. punctata* (1000 L₃ y 30 adultos, respectivamente) fueron incubados en las concentraciones efectivas medias de cada una de las combinaciones (0.8 y 0.84 mg mL⁻¹ para cumarina:quercetina y ácido cafeico:rutina, respectivamente). Las incubaciones se realizaron bajo las mismas condiciones previamente descritas (ver secc. 7.5.1 y 7.5.2). Inmediato a los tiempos de incubación (3 h y 24 h para L₃ y adultos, respectivamente), los ejemplares fueron colocados en tubos centrífugos (Falcon®) de 15 ml y fijados con

paraformaldehído, fueron transportados en una hielera térmica a 4 °C (Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2019) para ser procesados en el laboratorio de Microscopía Electrónica del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias de la UNAM en Ciudad Universitaria, CDMX. En el laboratorio, se retiró cuidadosamente el fijador que contenían las muestras y fueron lavadas con una Solución Buffer de Fosfatos (PBS), posteriormente se realizó una segunda fijación con tetraóxido de osmio al 2 % durante una hora para el caso de las L₃ y toda la noche para el caso de los adultos, transcurrido ese tiempo se lavaron de nuevo con PBS. Después, las muestras fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol (30, 50, 70, 80, 90, 96, 100 %) (Vázquez y Echeverría, 2000) y divididas en partes iguales para la finalización del proceso correspondiente a las técnicas de MEB y MET.

Una vez concluido el paso anterior, las muestras destinadas a MEB fueron secadas con CO₂ en un secador de punto crítico (BAL-TEC CPD 030[®]) y se recubrieron con oro durante cinco minutos en un ionizador (DESK II DENTON, VACUUM[®]). Finalmente, las L₃ y los adultos fueron observados con un microscopio electrónico de barrido (JSM-5310LV, JEOL[®]) a un voltaje de aceleración de 15 y 20 kv.

Por otro lado, a las muestras destinadas para MET se les realizó una pre-inclusión con óxido de propileno y resina Epon 812 (1:1) por 24 h; inmediatamente, las muestras fueron incluidas en resina epoxi polimerizada a 60 °C durante 24 h. Se realizaron cortes semifinos de 250 nm de grosor y se tiñeron con azul de toluidina para realizar una descripción general en el microscopio óptico y posteriormente realizar los cortes ultrafinos de 60 nm (Vázquez y Echeverría, 2000). Los cortes ultrafinos se realizaron mediante un micrótomo (Ultracut R, Leica[®]) y fueron colocados en una rejilla de cobre para contrastar con acetato de uranilo al 4 % (20 min y 30 min para L₃ y adultos, respectivamente) y posteriormente con citrato de plomo al 0.3 % durante 10 min. Finalmente, se realizó la observación de los cortes en un microscopio electrónico de transmisión (JEM 1010, JEOL[®]) a un voltaje de

aceleración de 80 kv. Para la captura y registro de imágenes se utilizó el software Digital Microscopy®.

7.7. Análisis estadístico.

Las concentraciones efectivas medias requeridas para inhibir la motilidad de parásitos adultos fueron calculadas para ambas combinaciones, mediante una regresión no-lineal y se utilizó una ecuación logística de cuatro parámetros con una pendiente variable. Previo al análisis, todos los datos se transformaron a logaritmo ($X=\log X$) y con una restricción del valor mínimo a cero y máximo a 100. Se calcularon los valores de CE_{50} y los intervalos con un 95 % de confianza, así como los valores de R^2 (GraphPad Prism V. 7.03®).

VIII. RESULTADOS.

8.1. Efecto de las combinaciones de los compuestos polifenólicos, cumarina:quercetina y ácido cafeico:rutina contra la motilidad de la L₃ de *C. punctata*.

El porcentaje de migración obtenido con el control negativo fue de 86.44 ± 3.22 %. Con ambos tratamientos se observaron bajos porcentajes de inhibición de la motilidad larvaria (Cuadro 4); no obstante, la combinación de ácido cafeico:rutina mostró un efecto inhibitorio estadísticamente mayor que la combinación de cumarina:quercetina ($P < 0.05$).

Cuadro 4. Concentraciones y porcentajes de inhibición de la motilidad.

Tratamiento	Concentración (mg mL ⁻¹)	Inhibición de la motilidad % (Media \pm EE)
Control positivo	10	88.52 ± 6.59 ^a
Cumarina:quercetina	0.8	3.82 ± 1.87 ^b
Ácido cafeico:rutina	0.84	13.95 ± 4.84 ^c

8.2. Efecto de las combinaciones de los compuestos polifenólicos, cumarina:quercetina y ácido cafeico:rutina contra la motilidad del adulto de *C. punctata*.

Los parásitos adultos pertenecientes a los diferentes grupos control utilizados para ambos tratamientos a las diferentes horas, mostraron una motilidad promedio de 100 ± 0.00 , 83.41 ± 1.59 y 74.54 ± 6.17 a las 6, 12 y 24 h post-tratamiento, respectivamente. La incubación de parásitos adultos a la máxima concentración con ácido cafeico:rutina no afectó la motilidad a las 6 h post-incubación; no obstante, con cumarina:quercetina se redujo en un 27.3 %. La inhibición de la motilidad a las 12 y 24 h post-incubación con ácido cafeico fue muy similar (87.01 % y 86.90 %, respectivamente); contrario a lo observado con cumarina:quercetina, donde se observó un incremento de inhibición de motilidad a la máxima concentración de 73.81 % y 100 % a las 12 y 24 h, respectivamente.

La CE_{50} que mostró un mayor coeficiente de determinación (R^2) fue la de cumarina:quercetina a las 24 h (0.073 ± 0.071 mg mL⁻¹; R^2 0.94) y ácido cafeico:rutina a las 12 h de exposición (0.192 ± 0.061 mg mL⁻¹; R^2 0.95) (Figura 10 y 11, respectivamente). Las concentraciones efectivas medias (CE_{50}), los intervalos de confianza del 95 % y el R^2 se muestran en el Cuadro 5.

Figura 9. Efecto de las concentraciones crecientes de la combinación cumarina:quercetina sobre la motilidad de *C. punctata* en diferentes tiempos (6, 12 y 24 horas).

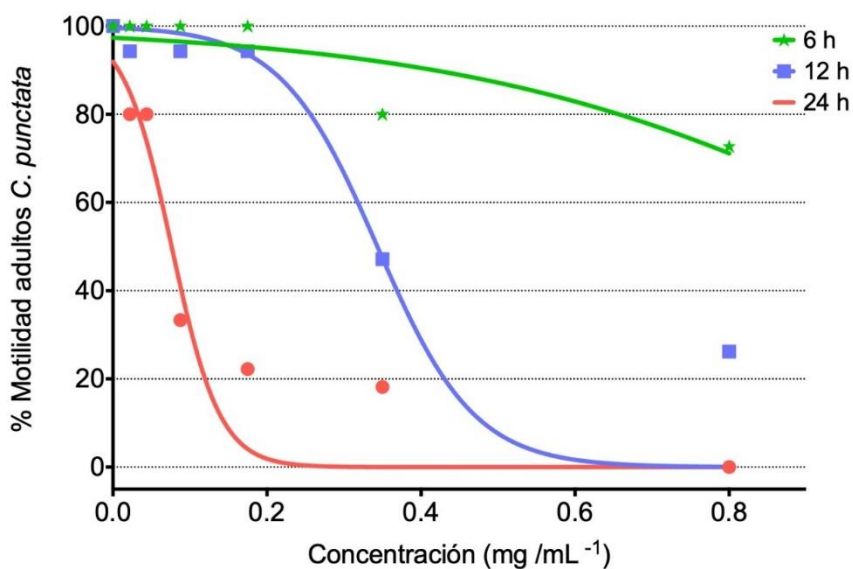
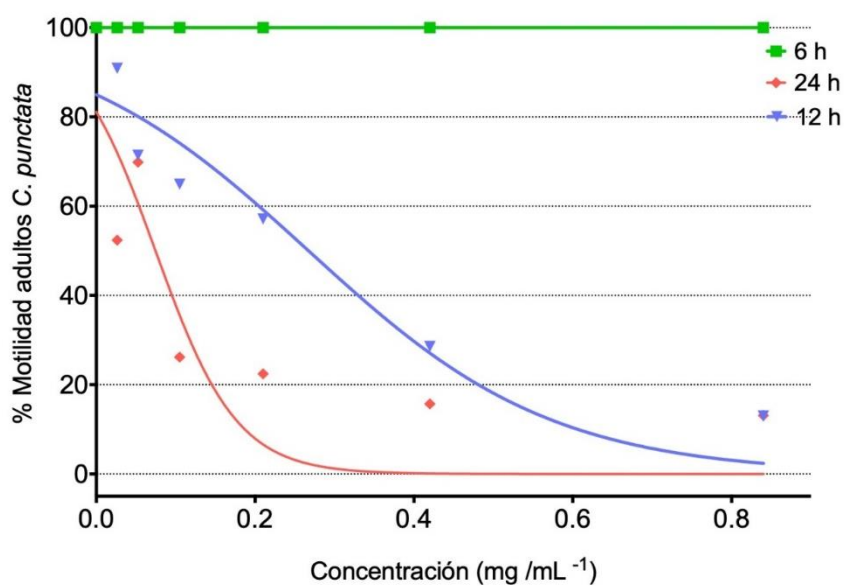


Figura 10. Efecto de las concentraciones crecientes de la combinación ácido cafeico:rutina sobre la motilidad de *C. punctata* en diferentes tiempos (6, 12, 24 horas).



Cuadro 5. Concentración efectiva media (CE₅₀), intervalo de confianza (IC) y coeficiente de correlación (R²) de las combinaciones de compuestos polifenólicos contra la motilidad en el adulto de *C. punctata*.

Combinación	Tiempo de exposición (horas)	CE ₅₀		Limite IC 95 %		R ²
		CE ₅₀ (mg mL ⁻¹)	EE	Inferior	Superior	
Cumarina:Quercetina	6	1.621	0.154	0.944	12.41	0.87
	12	0.398	0.064	0.267	0.677	0.93
	24	0.073	0.071	0.045	0.117	0.94
Ácido cafeico:Rutina	6	NE	NE	NE	NE	NE
	12	0.192	0.061	0.129	0.288	0.95
	24	0.051	0.164	0.0008	0.125	0.75

*NE: No estimado.

8.3. Cambios estructurales en L₃ de *C. punctata*.

En los especímenes que no fueron expuestos a tratamiento (Fig. 12. A1, A2 y A3) es posible observar, tanto en la región cefálica (A1) como en el cuerpo de la larva (A2 y A3), la conservación de su integridad estructural manteniendo su típica

forma cilíndrica. Así mismo, en las larvas del grupo control es posible observar un patrón de estrías transversales de la vaina bien definidas (asterisco negro).

Por otro lado, al comparar las L₃ de *C. punctata* del grupo control (columna A) con aquellas que fueron expuestas a las diferentes combinaciones, es posible observar una pérdida total de la integridad estructural de la vaina (columna B, C y D). Igualmente, y de modo generalizado, tanto en la región cefálica (B1-D1) como en el cuerpo de la larva (B2-D2 y B3-D3), se observa la vaina con una apariencia irregular, corrugada y marcadas depresiones (flecha amarilla), que denotan la pérdida de turgencia corporal (flechas rojas) a lo largo de la vaina de las L₃. Así mismo, y bajo un patrón focal difuso, es posible observar una pérdida en la definición de las estrías transversales de la vaina (flecha aqua).

8.4. Cambios estructurales en adultos de *C. punctata*.

En la figura 13. A1, B1 y C1 se muestra la vista lateral de la región cefálica de parásitos adultos de *C. punctata*. En todos los especímenes es posible observar un patrón definido de estrías transversales a lo largo de toda la cutícula parasitaria. En los ejemplares adultos incubados en los diferentes tratamientos (cumarina:quercetina y ácido cafeico:rutina; Figs. B1-4 y C1-4, respectivamente), se observa un incremento significativo de corrugaciones e invaginaciones cuticulares (flecha amarilla), que evidencian la pérdida de la integridad estructural de la cutícula; así como de la turgencia corporal (flecha aqua) y un incremento en la tonicidad electrodensa de la epidermis (Fig. B1, C1 y C4).

En la figura 13. A2, B2 y C2 se muestra la vista frontal de la región cefálica y cavidad oral (CO) sin cambios morfológicos evidentes. En las figuras A3 y A4 se presenta una vista dorso-lateral del cuerpo medio, con presencia de un patrón de estrías cuticulares transversales y longitudinales (PECT y PECL, respectivamente), así como la presencia de crestas cuticulares longitudinales (CCL), mismas que se

observan sin alteraciones morfológicas evidentes (Fig. A3 y A4). No obstante, en los parásitos expuestos a los tratamientos, es posible observar una pérdida en la definición del PECT (flecha roja) y deformación de las CCL (flecha negra). Así mismo, se presentan invaginaciones cuticulares de diversa profundidad; la presencia de surcos o invaginaciones cuticulares a lo largo de la cutícula parasitaria (flecha amarilla) dan una apariencia de rigidez cuticular con pérdida de turgencia (flechas aqua). Lesiones sugerentes de un daño estructural a nivel cuticular; mismo que es evidenciado con la pérdida de la morfología cilíndrica típica de los NGI.

8.5. Cambios ultraestructurales en L₃ de *C. punctata*.

- **Alteraciones en el complejo vaina-cutícula de la L₃.**

En las figuras 14. A1 y A2 podemos observar el complejo vaina-cutícula de L₃ de *C. punctata* incubadas en etanol al 2.5% (control negativo). Se observa la vaina (V) compuesta por epicutícula (EcV), zona cortical (CzV), zona basal (BzV) y su capa interna (IzV). De la CzV se originan las alas laterales de la vaina (AV), proyecciones que yacen sobre las alas laterales de la cutícula larvaria (ALc). Así mismo, en la figura A2 asociado a la capa interna de la vaina (IzV), se pueden observar dos especializaciones centrales de forma cilíndrica y electro-lúcidas (ILSp) que en su interior contienen material electro-denso dispuesto como un patrón de bandas horizontales. Las alas cuticulares (ALc) se observan como expansiones de la zona cortical de la cutícula de la larva y se encuentran rodeadas por la epicutícula. Entre las ALc y el LHyC se encuentra un espacio electro-lúcido dentro del cual se observa una proyección piramidal electrodensa correspondiente al cordón hipodérmico lateral (LHyC); observándose un patrón de fibras con diferente grado de electrodensidad (asterisco blanco). En todos los tratamientos (Fig. B2, C2 y D2) se observa una pérdida total del patrón de bandas de las ILSp (flecha amarilla); así mismo, se observa una pérdida de la definición y electrodensidad de las fibras

(flecha roja). En el tratamiento de ácido cafeico:rutina se observan tanto la CzV como las AV más electrolúcidas (flecha anaranjada; Fig. C2). Finalmente, se puede observar un adelgazamiento y pérdida de continuidad de la epicutícula de las L₃ (flecha azul); y la pérdida de los puntos de unión entre la vaina y cutícula larvaria que se evidencia con incremento en el espacio ocupado por la zona cortical de la cutícula parasitaria (asterisco rojo; Fig. B1 y D1).

- **Alteraciones en la célula de la costura lateral (seam cell) de la L₃.**

En las larvas del grupo control se observa el núcleo de una célula de la costura lateral (seam cell; NcSC), con la membrana nuclear (MNC) electrolúcida bien definida, la presencia de eucromatina (asterisco aqua) y heterocromatina (asterisco amarillo), sin alteraciones aparentes (Fig. A2). No obstante, las L₃ tratadas con cumarina:quercetina (Fig. B2), la membrana nuclear de la célula de la costura lateral parece ausente (flecha aqua), el nucleoplasma se encuentra con una electrodensificación generalizada que impide la diferenciación de la eucromatina y heterocromatina y con presencia de vacuolizaciones en citoplasma y nucleoplasma (flecha rosa) (Fig.14. B1). De igual manera, el citoplasma de las células intestinales se observa electrodenso (flecha verde) y una coalescencia de las gotas lipídicas. En contraste, el núcleo de las L₃ expuestas a ácido cafeico:rutina, es posible observar una pérdida total de la membrana nuclear (flecha aqua), condensación y marginación de la heterocromatina (asterisco amarillo) y una pérdida de electrodensidad de la eucromatina (asterisco aqua) (Fig. C2). Finalmente en el tratamiento con tiabendazol (Fig. D2) se observa una severa vacuolización en el citoplasma (flecha rosa) y un ligero incremento en la electrodensidad de la heterocromatina y eucromatina (asterisco amarillo y aqua, respectivamente).

En las figuras correspondientes al grupo control (Fig. 15. A1 y A2), complejo vaina-cutícula larvaria, se observa sin alteraciones y unidos a través de las especializaciones celulares de la capa interna electrodenso de la vaina (asterisco blanco). Se aprecia la epicutícula (EpC) como la capa más externa de la cutícula

larvaria; la cual forma anulaciones pseudometaméricas (surcos cuticulares). Se observa la zona cortical (ZC) electrolúcida, seguida por una capa electrodensa. La zona basal (ZB) presenta un patrón de fibras de colágena electrodensas dispuestas verticalmente. Es posible apreciar la hipodermis, seguida por hemidesmosomas (flecha aqua), el cuerpo denso (CD) y las placas de unión (flecha amarilla). Los sarcómeros se observan formando bandas A (corchete blanco) separadas entre sí por los CD y, dentro de las cuales, se logra apreciar la presencia de miofilamentos delgados dispuestos de modo difuso pero con mayor concentración en la periferia (asterisco aqua), los cuales presentan una menor electrodensidad que los miofilamentos anchos (asterisco verde) que se encuentran principalmente dispuestos lateralmente a la línea M (línea electrolúcida que divide la banda A). De modo generalizado, se observa un efecto directo de los tratamientos sobre el complejo vaina-cutícula larvaria, donde, con excepción del grupo tratado con Tiabendazol, la EpC de las L₃ pierde en su totalidad los puntos de unión con la ZC de la cutícula larvaria (flecha roja) y las anulaciones pseudometaméricas características de la misma; sin perder los sitios de unión con la capa interna electrodensa de la vaina y evidenciado con el incremento del espacio entre capas (asterisco rojo; Fig. B2, C1 y C2).

En el caso del control positivo (Thiabendazole[®] 99 %) se observa un adelgazamiento significativo e interrupción de la continuidad de la EpC con zonas donde se pierde la unión con la ZC y regiones donde éstas se separan (flecha y asterisco rojos; Fig. D1 y D2). Así mismo, en todos los tratamientos es posible apreciar un cambio en la electrodensidad de la capa interna electrodensa de la vaina (asterisco blanco). Las fibras de colágena de la ZB cuticular presentan una mayor electrolucidez y una menor definición (asterisco negro; Fig. B1, C1 y D1). Finalmente, se observan cambios en la electrodensidad de los hemidesmosomas (flecha aqua), los cuerpos densos y placas de unión (flecha amarilla). Igualmente, se observa que en el tratamiento de ácido cafeico;rutina, hay una desorganización de los miofilamentos en las bandas A del sarcómero, con una aparente reducción en número de miofilamentos delgados (flecha verde) por un posible incremento en

su electrolucidez (asterisco aqua) y un marcado incremento en la electrodensidad de los miofilamentos gruesos (asterisco verde; Fig. C1 y C2). Finalmente, en el control positivo (Thiabendazole® 99 %) se observa una marcada desorganización y pérdida de miofilamentos delgados (asterisco verde) así como un incremento en la electrodensidad de los miofilamentos gruesos y degeneración (asterisco aqua; Fig. D1-D2).

8.6. Cambios ultraestructurales en adultos de *C. punctata*.

Las figura 16. A1-3 presenta la vista de un corte transversal del cuerpo de parásitos adultos de *C. punctata* incubados en etanol al 2.5 % durante 24 h. Se puede observar la cutícula parasitaria (asterisco blanco) con su capa más superficial y la epicutícula parasitaria (EpC), que posee anulaciones pseudometaméricas (surcos cuticulares). De la capa cortical (CCo) surgen proyecciones en punta de naturaleza electrolúcidas (St) que dan origen a las crestas longitudinales (Cr). Posteriormente, se observa la zona medial (ZM) y la tri-capa fibrosa (CF) de la zona basal. De las cuales, dos poseen fibras largas dispuestas en espiral (asterisco verde) y son atravesadas por una tercer capa de fibras largas dispuestas longitudinalmente (asterisco amarillo; Fig. A3). De la LB surgen los hemidesmosomas (flecha aqua) que conectan con las células epiteliales (Fig. A3). Se aprecia la hipodermis (Hy) sin alteraciones, una electrodensidad uniforme y múltiples mitocondrias sin alteraciones aparentes (recuadro verde; Fig. A1).

En los parásitos expuestos al tratamiento cumarina:quercetina se observan mitocondrias con aparente tumefacción y con alteraciones en la electrodensidad tanto de las crestas como en la matriz mitocondrial (recuadros verdes; Fig. B2). Así mismo, se observa mayor electrolucidez de las capas fibrosas, tanto en espiral (asterisco verde) como longitudinal (asterisco amarillo), con una marcada pérdida en la definición de las fibras, una reducción de su longitud y un incremento en el

ángulo con respecto al eje de las fibras longitudinales (asterisco amarillo). También, se observa una disminución en la electrodensidad de los hemidesmosomas (flecha aqua; Fig. B3). Finalmente, se aprecian zonas electrolúcidas por aparente desprendimiento de la hipodermis (flecha roja; Fig. 16. B1), desarreglo celular y electrodensificación de la hipodermis (recuadro naranja; Fig. B1).

Por último, los parásitos incubados en ácido cafeico:rutina (Fig. C1-C3) muestran una reducción unilateral de miofilamentos delgados (recuadro rojo; Fig. C1) así como un incremento parcial en la electrodensidad de los miofilamentos gruesos (recuadro negro; Fig. C2). Como, también, se observan variaciones focales en la electrodensidad de las tres capas fibrosas, con zonas más electrodensas y presencia de espacios electrolúcidos (asteriscos verde y amarillo, respectivamente); también, un acortamiento en la longitud de las fibras y un incremento en el ángulo respecto al eje de fibras longitudinales. De igual manera, se aprecia una evidente electrodensificación en los hemidesmosomas (flecha aqua; Fig. C3) y zonas electrolúcidas por aparente desprendimiento de la hipodermis (flechas rojas; Fig. C1-C3)

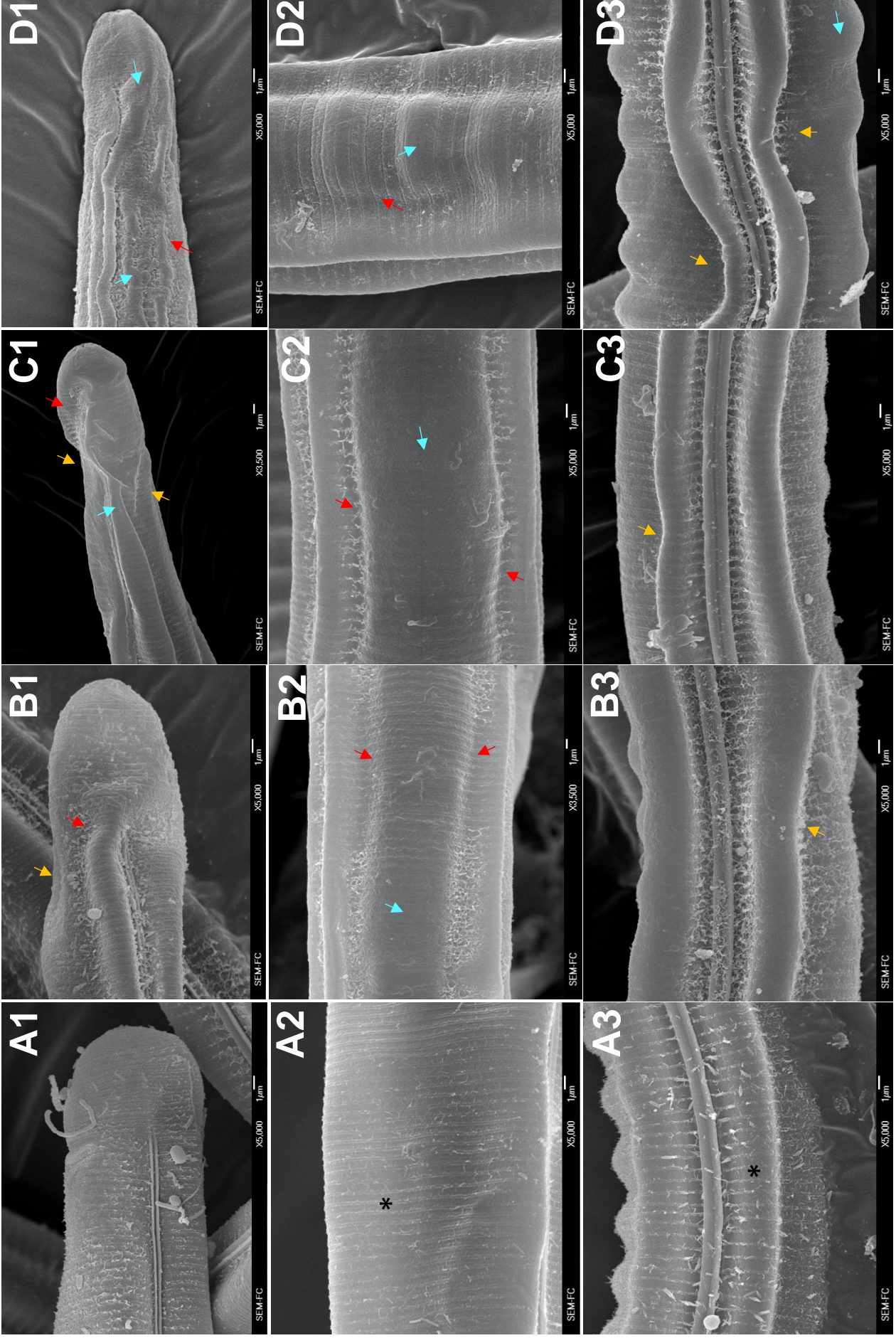


Figura 11. Larvas infectantes de *Cooperia punctata* observadas mediante Microscopia Electrónica de Barrido posterior a su incubación por 3 h en Solución Salina Fisiológica (A1-A3); cumarina:quercetina (8:2) (B1-B3); ácido cafeico:rutina (8:2) (C1-C3); y Tiabendazol (D1-D3).

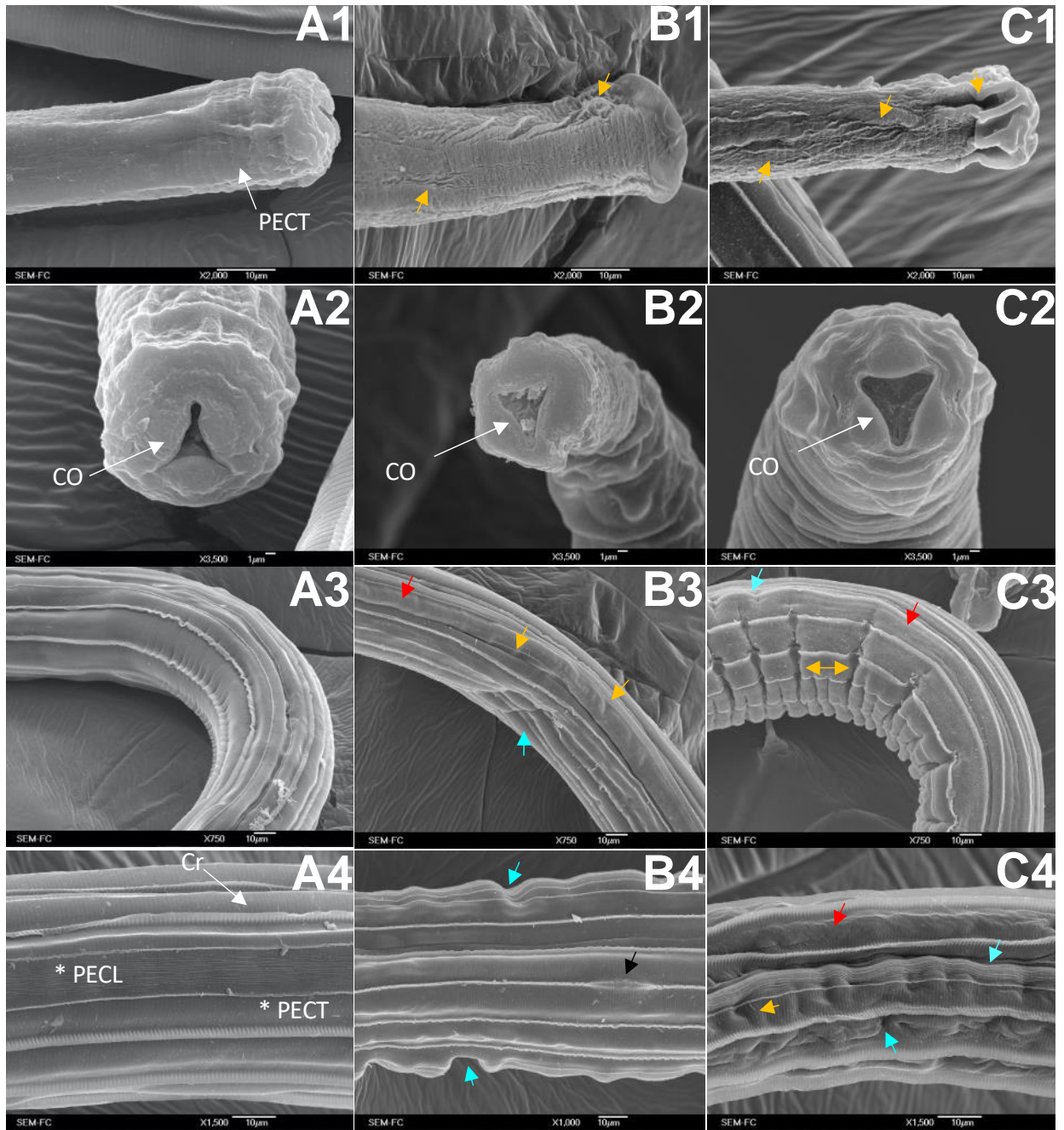


Figura 12. Parásitos adultos de *Cooperia punctata* observados mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) posterior a su incubación por 24 h en etanol al 2.5% (control negativo; A1-A4); cumarina:quercetina (B1-B4); ácido cafeico:rutina (C1-C4).

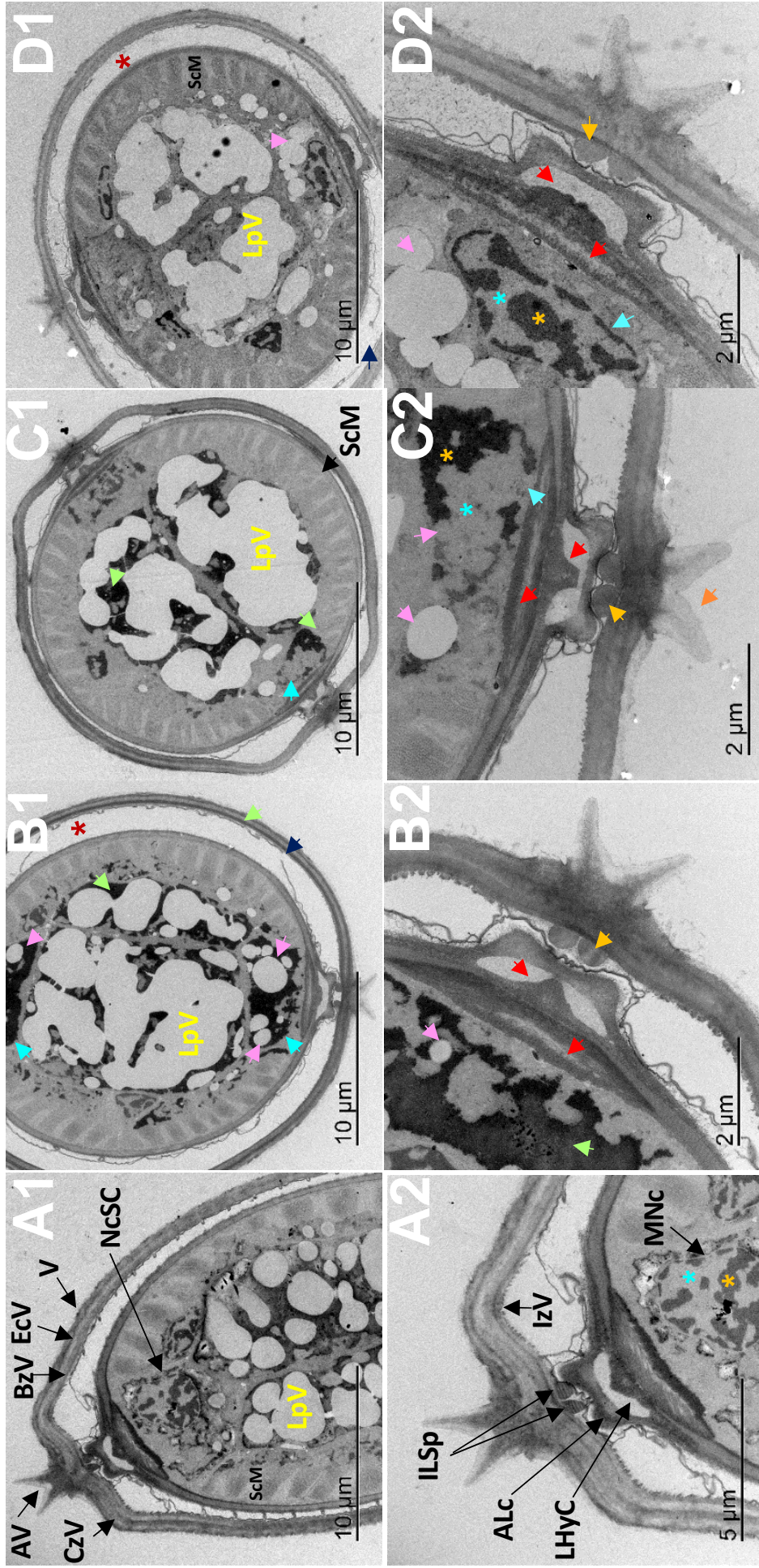


Figura 13. Larvas infectantes de *Cooperia punctata* observadas mediante Microscopía Electrónica de Transmisión posterior a su incubación por 3 h en etanol al 2.5% (control negativo; A1 y A2); cumarina:quercetina (B1 y B2); ácido cafeico:rutina (C1 y C2); y Tiabendazol (D1 y D2).

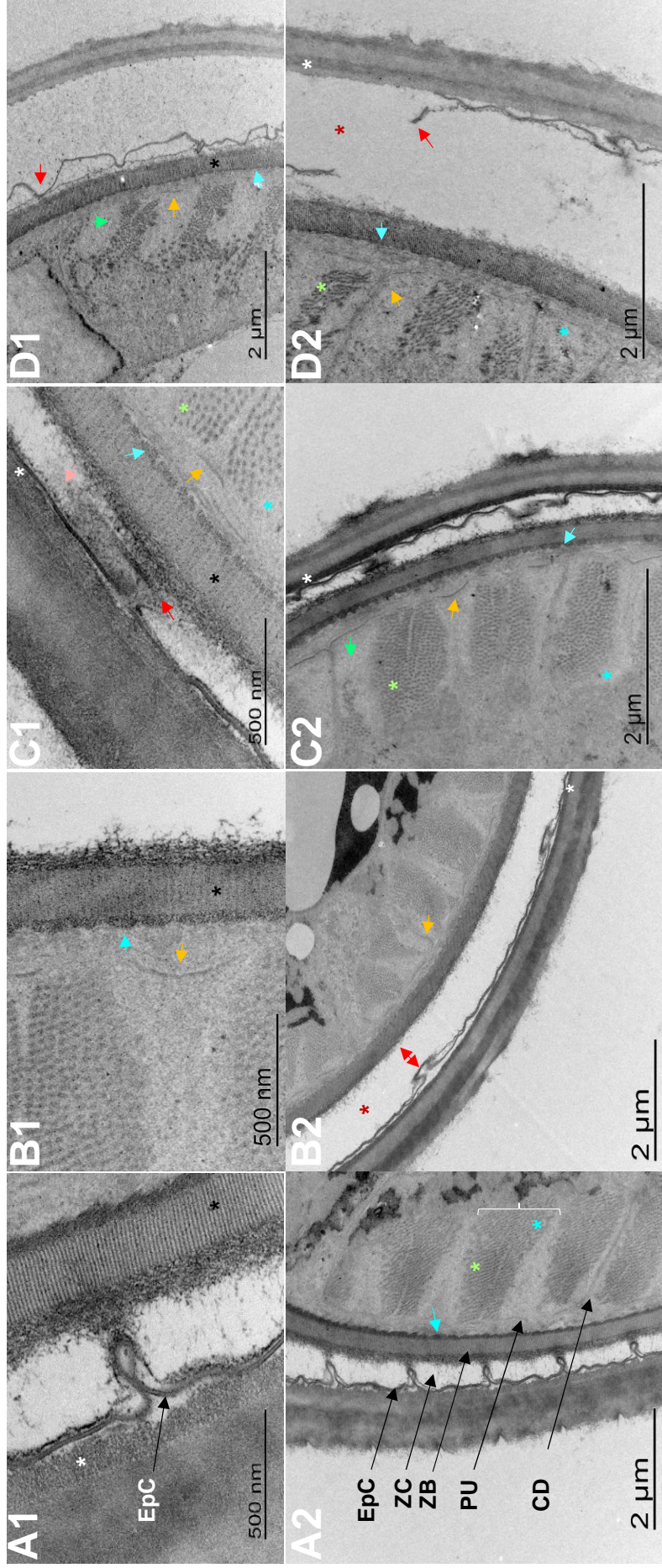


Figura 14. Larvas infectantes de *Cooperia punctata* observadas mediante Microscopía Electrónica de Transmisión posterior a su incubación por 3 h en etanol al 2.5% (control negativo; A1 y A2); cumarina:quercetina (B1 y B2); ácido cafeico:rutina (C1 y C2); y Tiabendazol (D1 y D2).

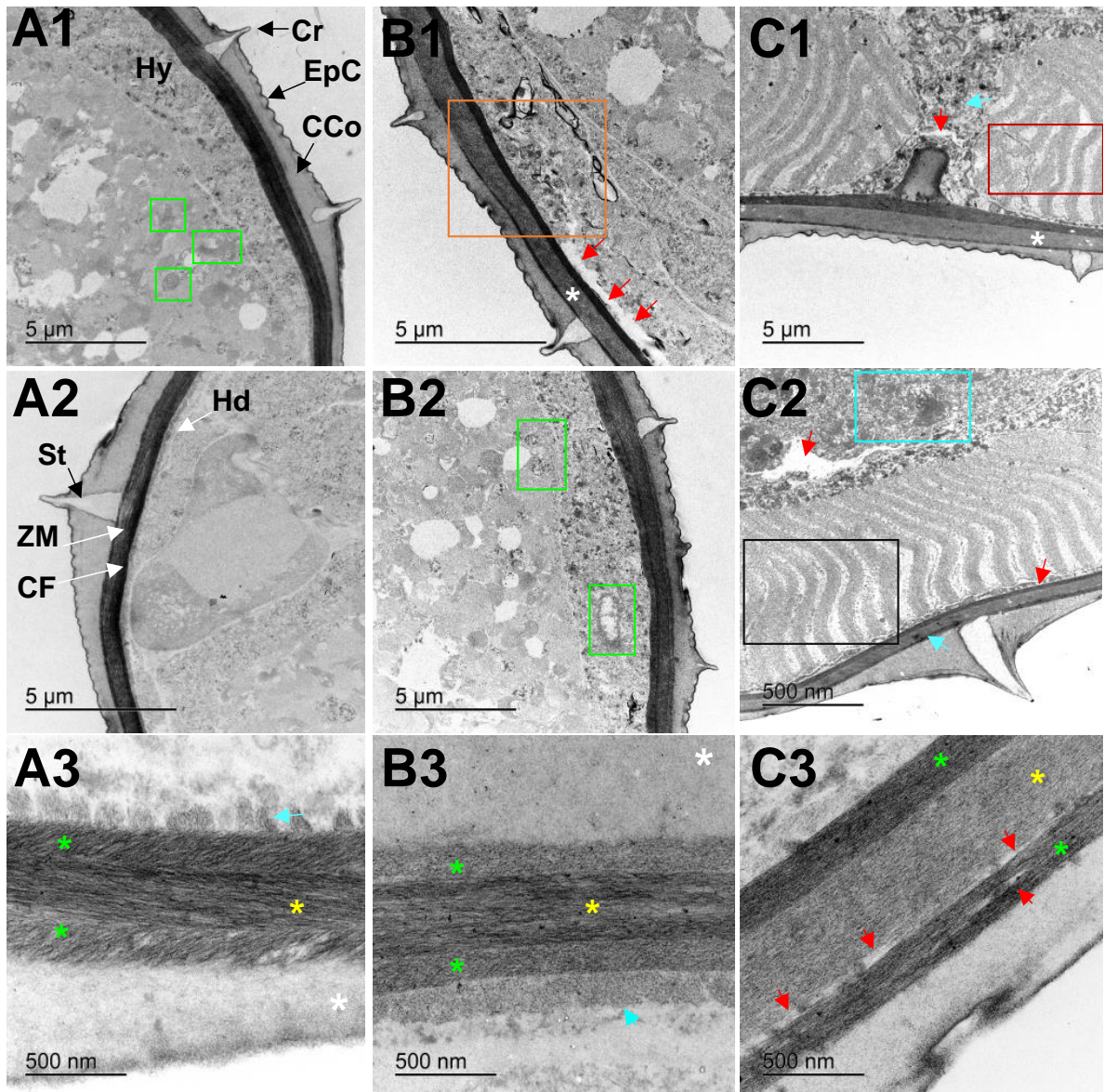


Figura 15. Parásitos adultos de *Cooperia punctata* observadas mediante Microscopía Electrónica de Transmisión posterior a su incubación por 24 h en etanol al 2.5 % (control negativo; A1-A3); cumarina:quercetina (B1-B3); ácido cafeico:rutina (C1-C3).

IX. DISCUSIÓN.

El desarrollo de nuevos medicamentos representa un proceso lento y muy costoso para la industria farmacéutica; se ha reportado que la evaluación y desarrollo de nuevos fármacos puede tardar hasta 15 años y costar alrededor de \$1.2 mil millones de dólares, asegurando únicamente una tasa de éxito del 5% (Geary *et al.*, 2015). En los últimos 20 años de la industria antihelmíntica solamente se ha logrado introducir una nueva familia al mercado, los derivados amino-acetonitrílicos (AAD) (Geary *et al.*, 2015); no obstante, el mismo año de su lanzamiento se presentaron los primeros reportes de resistencia antihelmíntica (RA) a los AAD (Kaminski *et al.*, 2008; Scott *et al.*, 2013; Geary *et al.*, 2015). El evidente retraso en la industria de los productos antihelmínticos y la creciente emergencia de RA ha favorecido, indudablemente, a la generación de avances en innovación tecnológica computarizada como el acoplamiento molecular (molecular Docking) y el Sistema de Cribado de Alto Rendimiento (HTS, por sus siglas en inglés); y se ha apoyado en la incorporación de otras disciplinas como las genómicas, la química y la biología. Áreas que convergen con la finalidad de eficientizar el proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos, bajo un enfoque de descubrimiento de medicamentos, ya sea basado en estructuras o en biomoléculas (proteínas o genes) (Petrova, 2013). No obstante, y a pesar de los avances tecnológicos, el sub-desarrollo en la industria de antihelmínticos de uso veterinario persiste. Situación atribuida a la limitada identificación tanto de biomoléculas como de características de acoplamiento molecular deseables para el desarrollo de nuevos medicamentos AH; y que, a su vez, ha sido asociado al escaso conocimiento de la biología de muchos de los parásitos que afectan a los animales útiles al hombre (Geary *et al.*, 2015).

No obstante, y a pesar de que la utilización de bioensayos *in vitro* se ha descrito como una herramienta costosa y lenta en la industria farmacéutica, también representa una herramienta que con una menor inversión permite la evaluación de moléculas sobre diferentes etapas del ciclo biológico de los parásitos (Hoste *et al.*,

2008; Geary *et al.*, 2015). Estudios *in vitro* e *in vivo* han reportado la capacidad de los MSP para inhibir diferentes fases del ciclo biológico de los NGI como: i) la eclosión, ii) desarrollo, iii) migración, iv) desenvaine, v) la motilidad de adultos y vi) la fecundidad en hembras parásitas (Hoste *et al.*, 2012). No obstante, la utilización de bioensayos solamente nos permite evaluar un efecto generalizado y no permite proponer un posible mecanismo de acción (Mayoral-Peña *et al.*, 2017). Establecer los posibles mecanismos de acción es importante, ya que ha sido considerado un prerrequisito para la utilización de productos naturales de las plantas como medicamentos; debido posiblemente a que permite asegurar una consistencia del efecto AH, repetibilidad y la identificación de toxicidades específicas (Behnke *et al.*, 2008). Existen múltiples herramientas para proponer el posible mecanismo de acción de nuevas moléculas bioactivas, dentro de las cuales se encuentran la microscopía electrónica de barrido (MEB) y de transmisión (MET); técnicas que permiten evaluar el efecto de nuevos fármacos sobre la morfología y ultraestructuras de agentes patógenos (Wenzel *et al.*, 2019).

Los CPf's y las concentraciones utilizadas en este proyecto de investigación fueron seleccionadas con base en los resultados de estudios previos que reportaron su capacidad para inhibir la eclosión y el desenvaine larvario de *C. punctata* (Escareño-Díaz *et al.*, 2019). En consistencia con el reporte de Paolini *et al.* (2003), los resultados obtenidos en este proyecto mostraron que las concentraciones de CPf's utilizadas tienen mayor efecto contra la motilidad de los parásitos adultos que en las L₃; lo cual puede asociarse a diferencias en los sitios de acoplamiento molecular que existen entre ambas fases del ciclo biológico. Diversos estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, han reportado que existen diferencias en la susceptibilidad de los NGI a los compuestos orgánicos con actividad antihelmíntica y que pueden depender del género parasitario, fase parasitaria, e inclusive, de su sitio de localización dentro del hospedero (Paolini *et al.*, 2003; Alonso-Díaz *et al.*, 2008; von Son-de Fernex *et al.*, 2012; Page *et al.*, 2014; Escareño-Díaz *et al.*, 2019).

Por otro lado, la detección de actividad antihelmíntica de los MSP contra nematodos adultos se ha realizado, en su mayoría, con extractos de plantas ricas

en taninos (Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2013). Estudios recientes han reportado la capacidad de los MSP para provocar una parálisis total en ejemplares adultos de *Cooperia oncophora*, 24 h post-incubación en 150 µg de extracto de achicoria/ mL⁻¹ (Peña-Espinosa *et al.*, 2017); concentraciones consistentes con las CE₅₀ obtenidas en este proyecto de investigación (0.073 ± 0.071 mg mL⁻¹ y 0.192 ± 0.061 mg mL⁻¹ para cumarina:quercetina y ácido cafeico:rutina, respectivamente).

En este proyecto las lesiones principales identificadas, tanto en las L₃ como en adultos a través de MET, fueron sobre las siguientes estructuras: i) complejo vaina-cutícula de L₃, se observó una pérdida de la continuidad de las membranas, degradación de las bandas colágenas de la zona basal de la vaina y degradación de las bandas colágenas presentes en las especializaciones laterales de la capa interna de la vaina; ii) alteraciones en la electrodensidad, ángulo y longitud de las fibras helicoidales, iii) leve a moderada degeneración de miofibrillas delgadas en los sarcómeros, en L₃ y adultos, respectivamente; iv) tumefacción mitocondrial y v) apoptosis celular.

Las alteraciones observadas en el complejo vaina-cutícula son indicativas del efecto protector que ejerce la vaina contra agentes químicos (Neuhaus *et al.*, 1996) y consistentes con su capacidad para inhibir el desenvaine larvario (Escareño-Díaz *et al.*, 2019). Así mismo, las alteraciones observadas sobre el colágeno cuticular y el colapso estructural de ambas fases de *C. punctata* expuestas a ambos tratamientos pueden asociarse a las propiedades descritas tanto para el ácido cafeico como la cumarina, que incluyen: i) actividad fibrinolítica e ii) inhibición del factor de crecimiento epidérmico y metaloproteinasas; las cuales se expresan en el tejido hipodérmico de los nematodos y son necesarias para la secreción normal de colágeno (Abuzar *et al.*, 2013; Page *et al.*, 2014). Las alteraciones estructurales observadas en este estudio, son consistentes con reportes previos que relacionan las alteraciones de colágeno cuticular con la morfología cilíndrica de los nematodos; ya que el colágeno y otras proteínas similares constituyen el 80 % de los componentes estructurales de la cutícula parasitaria (Page, 2014).

Por otro lado, el efecto sobre la motilidad de *C. punctata* también puede asociarse a la capacidad del ácido cafeico, la cumarina y la quercetina, para inhibir la acetilcolinesterasa (AChE) (Anwar *et al.*, 2012; Szwajgier, 2015); enzima esencial para la regulación de la transmisión colinérgica en nematodos (Selkirk *et al.*, 2005). Mientras que para la cumarina se ha reportado que tiene la capacidad de bloquear la vía del receptor de octopamina (Narayanaswamy *et al.*, 2014); amina biogénica que participa en la modulación de los procesos de bombeo faríngeo, contracciones musculares y ovoposición de los nematodos (Komuniecki *et al.*, 2004).

No obstante, y a pesar de que el mecanismo de acción de los fitoquímicos sobre la motilidad parasitaria no ha sido determinado, se ha propuesto que la inhibición de la motilidad es el resultado del bloqueo fitoquímico de las neuronas sensoriales (Engström *et al.*, 2016). Y aunque es altamente probable que uno o la combinación de dos o más efectos neurotóxicos, descritos previamente, tanto de la cumarina como del ácido cafeico y los otros CPf's, estén asociados a la actividad antihelmíntica de los tratamientos contra *C. punctata*, no podemos descartar la posibilidad de que algunas alteraciones mecánicas estén involucradas en dicho efecto.

Los nematodos poseen un esqueleto hidrostático, en el cual, la deformación de la cutícula y su locomoción dependen de la integridad y correcto funcionamiento de estructuras como: i) la disposición de fibras musculares, ii) la tri-capa de fibras helicoidales de tejido conectivo a nivel cuticular (rígidas e inextensibles), iii) el fluido interno presurizado, iv) el patrón de estrías cuticulares (transversales y longitudinales) que se asocian a la flexibilidad cuticular y que permite su enroscamiento y v) alas laterales, que proporcionan rigidez longitudinal y permiten el cambio de diámetro de la forma del cuerpo de los mismos (Clark y Cowey, 1958; Lee, 2002; Kier, 2012). Las micrografías de barrido, tanto de L₃ como de adultos de *C. punctata*, mostraron la presencia de cambios en el diámetro del cuerpo, múltiples zonas de colapso estructural en la región cefálica y caudal, pérdida de turgencia y pérdida parcial del patrón de estrías cuticulares. Los cambios en su morfología cilíndrica son consistentes con las alteraciones observadas a través de MET, sobre

las fibras helicoidales de la cutícula, con la disminución de miofilamentos delgados y con el incremento en la electrodensidad de los miofilamentos gruesos observado en los sarcómeros de parásitos adultos. Así mismo, las deformaciones morfo-estructurales son consistentes con reportes recientes, que indican que el ácido cafeico, la rutina y la quercetina tienen la capacidad de inhibir la producción de colágeno en los tejidos, generar una reducción de las estructuras alfa-hélice de los miofilamentos delgados e incrementar el número de láminas plegadas y giros beta presentes en los miofilamentos gruesos del tejido muscular; lo cual deriva en el enroscamiento del tejido (Cheng *et al.*, 2020).

Finalmente, la presencia de células apoptóticas, vacuolas citoplasmáticas, condensación y marginación de la cromatina en el núcleo celular, tanto en los parásitos adultos como en L₃, son indicativos de un efecto citotóxico de la combinación de dichos compuestos polifenólicos. Lesiones consistentes con estudios previos, que describen al ácido cafeico como una molécula pro-apoptótica tiempo y concentración-dependiente, que promueve la condensación y marginación de cromatina e induce apoptosis mediada por mitocondrias (Jin *et al.*, 2008; Cavaliere *et al.*, 2013). Así mismo, las lesiones observadas en los tratamientos de cumarina:quercetina son consistentes con la actividad anti-leishmania previamente reportada para la cumarina; la cual se caracteriza por generar una vacuolización del citoplasma y tumefacción mitocondrial (Brenzan *et al.*, 2007).

Petzold *et al.* (2011) reporta que, en los tratamientos antihelmínticos que inducen una parálisis rígida, es posible observar un marcado colapso de la morfología cilíndrica de los nematodos que se presenta con mayor intensidad en la región cefálica y caudal de los mismos; y que los cambios en la longitud total y diámetro del cuerpo son representativos de alteraciones del tono muscular de la pared corporal. El uso de MEB, en este proyecto de investigación, permitió identificar cambios estructurales, como pérdida de turgencia, colapso estructural, un aparente incremento de diámetro corporal en los ejemplares incubados en ácido cafeico:rutina y la reducción del mismo en aquellos incubados en cumarina:quercetina. Mientras que el uso de MET permitió observar cambios en la

electrodensidad y abundancia de miofilamentos en los sarcómeros; así como, cambios en la orientación, angulación y electrodensidad de la tri-capa de tejido conectivo helicoidal de la zona basal en la cutícula parasitaria.

La integración de diversas técnicas como los bioensayos *in vitro* y microscopía electrónica tanto de barrido como de transmisión nos permite realizar un análisis global de los resultados, considerando: i) la bioactividad observada a través de bioensayos *in vitro*, ii) la combinación de hallazgos obtenidos a través de las herramientas diagnósticas por imagen, iii) las diferencias en los cuadros lesionales de cada tratamiento y iv) la bioactividad reportada en la literatura por diferentes autores. Análisis que nos permite sugerir que, independiente al efecto citotóxico generado por ambos tratamientos, la incubación de parásitos adultos de *C. punctata* en ácido cafeico:rutina genera daño en los sarcómeros y fibras helicoidales sugerente de una parálisis espástica (Petzold *et al.*, 2011); mientras que en la combinación cumarina:quercetina predomina la citotoxicidad.

En conjunto, podemos concluir que cada una de las estructuras que conforman la cutícula parasitaria y tejido muscular se encuentran directamente relacionados con la motilidad y supervivencia de los parásitos. Y que la combinación de compuestos orgánicos, como los CPf's utilizados, permiten no solo potencializar la actividad AH (Escareño-Díaz *et al.*, 2019) sino también afectar diversas estructuras de la biología de los nematodos que resultan en su muerte. Después de evaluar la drogabilidad, toxicidad y farmacocinética de las combinaciones de CPf's, estas podrían considerarse para su evaluación *in vivo*.

X. CONCLUSIÓN.

La combinación de estos compuestos polifenólicos inhiben la motilidad de parásitos adultos y en menor proporción a las L₃ de *C. punctata*. Los cambios estructurales y ultraestructurales observados son sugerentes de ocasionar una parálisis rígida que limita la viabilidad de *C. punctata* y con ello podrían favorecer la interrupción de su ciclo biológico; que, tras determinar una posible toxicidad, drogabilidad de la formulación y su farmacocinética, podrían representar una alternativa viable de control parasitario.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Abuzar ME, Rosline H, Zamzuri I, Zulkifli M, Wan-Arfah N, Wan-Zaidah A. Fibrinolytic activity of caffeic acid phenethyl ester (cape): *in vitro* study on whole blood clot. Int J Pharm Pharm Sci 2013; 5: 459-462.

Adekunle OK, Aderogba MA. Characterisation of an antinematocidal compound from *Leucaena leucocephala*. Australas Plant Dis Notes 2008; 3: 168-170.

Alday-Provencio S, Díaz G, Rascon L, Quintero J, Alday E, Robles-Zepeda R, Garibay-Escobar A, Astiazaran H, Hernandez J, Velazquez C. Sonoran Propolis and some of its chemical constituents inhibit *in vitro* growth of *Giardia lamblia* trophozoites. Plant Med 2015: 3-8.

Alonso MA, Arnaud RA, Becerra R, Torres JFJ, Rodriguez R, Quiroz RH. Frequency of cattle farms with ivermectin resistant gastrointestinal nematodes in Veracruz, Mexico. Vet Parasitol 2015; 212: 439-443.

Angulo-Cubillán Francisco J. Nematodosis Gastrointestinales. Manual de Ganadería de Doble Propósito, 2005.

Anwar J, Spanevello RM, Thomé G, Stefanello N, Schmatz R, Gutierrez J, *et al.* Effects of caffeic acid on behavioral parameters and on the activity of acetylcholinesterase in different tissues from adults rats. Pharmacol Biochem Behav 2012; 103: 386-394.

Akhtar MS, Iqbal Z, Khan MN, Lateef M. Anthelmintic activity of medicinal plants with particular reference to their use in animals in the Indo-Pakistan subcontinent. Small Rumin Res 2000; 38: 99-107.

Azando EVB, Hounzangbé- Adoté MS, Olounladé PA, Brunet S, Fabre N, Valentin A, Hoste H. Involvement of tannins and flavonoids in the *in vitro* effects of

Newbouldia laevis and *Zanthoxylum zanthoxyloides* extracts on the exsheathment of third-stage infective larvae of gastrointestinal nematodes. *Vet Parasitol* 2011; 180: 292-297.

Barrau E, Fabre N, Fouraste I, Hoste H. Effect of bioactive compounds from sainfoin (*Onobrychis vicifolia Scop*) on the in vitro larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. *Parasitol* 2005; 131: 531-538.

Becerra R, Alonso MA, Fernández A, Quiroz RH. First report of cattle farms with gastrointestinal nematodes resistant to levamisole in Mexico. *Vet Parasitol* 2014; 204: 285-290.

Behnke J, Buttle D, Stepek G, Lowe A, Duce I. Developing novel anthelmintics from plant cysteine proteinases. *Paras Vect* 2008; 29: 1-18.

Besier RB, Khan LP, Sargison ND, van-Wyk JA. Diagnosis, treatment and management of *Haemonchus contortus* in small ruminants. *Adv Parasitol* 2016; 93: 181-238.

Blanchard A, Guégnard F, Charvet CL, Crisford A, Courtot E, Sauvé C, *et al.* Deciphering the molecular determinants of cholinergic anthelmintic sensitivity in nematodes: When novel functional validation approaches highlight major differences between the model *Caenorhabditis elegans* and parasitic species. *PLoS Pathog* 2018; 14: 1-28.

Borges F, Almeida G, Heckler R, Lemus R, Onizuka M, Borges D. Anthelmintic resistance impact on tropical beef cattle productivity: effect on weight gain of weaned calves. *Trop Anim Health Prod* 2012; 45: 723-727.

Bowman DD, Coles TB, Eberhard ML, Lightowers MW, Lynn RC, Little SE. *Georgis' Parasitology for Veterinarians*. USA: Elsevier Saunders; 2014.

- Bradbury S, Joy DC. Electron microscope. Encyclopedia Britannica, 2019.
- Brenzan AM, Vataru C, Prado B, Ueda-Nakamura T, Young MCM, García DA. Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. Parasitol Res 2007; 101: 715-722.
- Brunet S, Fourquaux L, Hoste H. Ultrastructural changes in the third-stage, infective larvae of ruminant nematodes treated with sanfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract. Parasitol Inter 2011; 60: 419-424.
- Buss BH, Lehnen CR, Abdallah R. Anthelmintic resistance in cattle: A systematic review and meta-analysis. Livest Sci 2018; 217: 127-135.
- Canul-Ku HL, Rodríguez RI, Torres JFJ, Aguilar AJ, Pérez LC, Ojeda MM. Prevalence of cattle herds with ivermectin resistant nematodes in the hot sub-humid tropics of Mexico. Vet Parasitol 2012; 183: 292-298.
- Cardoso CP, Silva BF, Trinca LA, Amarante AFT. Resistance against gastrointestinal nematodes in Crioulo Lageano and crossbred Angus cattle in southern Brazil. Vet Parasitol 2013; 192: 183-191.
- Castañeda-Ramírez GS, Mathieu C, Vilarem G, Hoste H, Mendoza-de-Gives P, González-Pech PG, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA. Age of *Haemonchus contortus* third stage infective larvae is a factor influencing the *in vitro* assessment of anthelmintic properties of tannin containing plant extracts. Vet Parasitol 2017; 243: 130-134.
- Castillo GF, Olmedo A, Rojo R, González M, Mendoza-de Gives P, Hernández EE, Reyes DE, López ME, JF Vázquez JF, Ramírez G, Zamilpa A. Caffeoyl and coumaroyl derivatives from *Acacia cochliacantha* exhibit ovicidal activity against *Haemonchus contortus*. Journ Ethnopharmac 2017; 204: 125-131.

Cavaliere V, Papademetrio DL, Lombardo T, Constantino SN, Blanco GA, Álvarez EMC. Caffeic acid phenylethyl ester and MG132, two novel nonconventional chemotherapeutic agents, induce apoptosis of human leukemic cells by disrupting mitochondrial function. *Targ Oncol* 2013.

Charlier J, Hoglund J, von Samson-Himmelstjerna G, Dorny P, Vercruysse J. Gastrointestinal nematode infections in adult dairy cattle: impact on production, diagnosis and control. *Vet Parasitol* 2009; 164: 70-79.

Charlier J, van-der-Voort M, Kenyon F, Skuce P, Vercruysse J. Chasing helminths and their economic impact on farmed ruminants. *Cell Press* 2014; 30: 361-367.

Charlier J, Vande F, van-der-Voort M, Meensel, Lauwers L, Cauberghe V, Vercruysse J, Claerebout E. Econohealth: Placing helminth infections of livestock in an economic and social context. *Vet Parasitol* 2015; 212: 62-67.

Charlier J, Thamsborg SM, Bartley DJ, Skuce PJ, Kenyon F, Geurden T, Hoste H, Williams AR, Sotiraki S, Höglund J, Chartier C, Geldhof P, van Dijk J, Rinaldi L, Morgan ER, von Samson-Himmelstjerna G, Vercruysse J, Claerebout E. Mind the gaps in research on the control of gastrointestinal nematodes of farmed ruminants and pigs. *Transbound Emerg Dis* 2018; 65: 217-234.

Charlier J, Höglund J, Morgan E, Geldhof P, Vercruysse J, Claerebout E. Biology and epidemiology gastrointestinal nematodes in cattle. *Vet Clin Food Anim* 2020; 36: 1-15.

Cheng J, Zhu M, Liu X. Insight into the conformational and functional properties of myofibrillar protein modified by mulberry polyphenols. *Food Chem* 2020; 308:1-7.

Chollet JY, Jacquet Ph, Cardinale E, Ndamkou C, Diop C, Thiam A, Dorchies Ph. *Cooperia pectinata* and *C. punctata*, parasites of the abomasum of cattle in northern Cameroon (Central Africa). *Vet Parasitol* 2000; 88: 135-138.

Chong K, Deng Y. The Three Dimensionality of Cell Membranes: Lamellar to Cubic Membrane Transition as Investigated by Electron Microscopy. *Methods in cell biology*, 2012; 108: 319-343.

Clark RB, Cowey JB. Factors controlling the change of shape of certain nemertean and turbellarian worms. 1958; 731-748.

CONAGUA. Estadísticas del agua en México 2017. Disponible en: http://sina.conagua.gob.mx/publicaciones/EAM_2017.pdf

Cordero-del-Campillo M, Rojo FA, Martínez AR, Sánchez C, Hernández S, Navarrete I, Díez P, Quiroz H, Carvalho M. *Parasitología General*. México: McGraw Hill; 2007.

Corro M, Rubio I, Castillo E, Galindo L, Aluja A, Galina CS, Murcia C. Effect of blood metabolites, body condition and pasture management on milk yield and postpartum intervals in dual-purpose cattle farms in the tropics of the State of Veracruz, Mexico. *Prevent Vet Medic* 1999; 38: 101-117.

Desrués O, Peña-Espinoza M, Hansen TVA, Enemark HL, Thamsborg SM. Anti-parasitic activity of pelleted sanfoin (*Onobrychis viciifolia*) against *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* in calves. *Parasit & Vect* 2016; 9: 329.

Dimander S. Epidemiology and control of gastrointestinal nematodes in first-season grazing cattle in Sweden. [Tesis de doctorado]. Uppsala (Se): Swedish University of Agricultural Sciences; 2003.

Dubey S, Ganeshpurkar A, Bansal D, Dubey N. Experimental studies on bioactive potential of rutin. *Drugs Discover Lab* 2019; 4; 153:157.

Dupuy J, Larrieu G, Sutra JF, Lespine A, Alvinerie M. Enhancement of moxidectin bioavailability in lamb by a natural flavonoid: quercetin. *Vet Parasitol* 2003; 112: 337-347.

Encalada LA, López ME, Mendoza-de Gives P, Liébano E, Vázquez V, Vera G. Primer informe en México sobre la Resistencia a ivermectina en bovinos infectados naturalmente con nematodos gastrointestinales. *Vet Méx* 2008; 39: 423-428.

Encalada L, Corbala A, Vargas J, García M, Uicab L, del Río J. Prevalencia de nematodos gastroentéricos de becerros en sistemas de doble propósito del municipio de Escárcega, Campeche, México. *Agrocienc* 2009; 43: 569-576.

Engström MT, Karonen M, Ahern JR, Baert N, Payré B, Hoste H, Salminen JP. Chemical structures of plant hidrolizable tannins reveal their *in vitro* activity against egg hatching and motility of *Haemonchus contortus* nematodes. *J Agric Food Chem* 2016; 64: 840-851.

Escareño-Díaz S, Alonso MA, Mendoza-de Gives P, Castillo E, von Son- de Fernex. Anthelmintic-like activity of polyphenolic compounds and their interactions against the cattle nematode *Cooperia punctata*. *Vet Parasitol* 2019; 274: PAGINAS.

Fabiyi JP, Copeman DB, Hutchinson GW. Abundance and survival of larvae of the cattle nematodes *Cooperia punctata*, *Haemonchus placei* and *Oesophagostomun radiatum* from faecal pats in a wet tropical climate. *Aust Vet J* 1988; 65: 229-231.

Fetterer RH, Rhoads ML. Biochemistry of the nematode cuticle: relevance to parasitic nematodes of livestock. *Vet Parasitol* 1993; 46: 103-111.

Fiel CA, Fernández AS, Rodríguez EM, Fusé LA, Steffan PE. Observations on the free-living stages of cattle gastrointestinal nematodes. *Vet Parasitol* 2012; 187: 217-226.

Fiel C, Steffan P. Parasitosis gastrointestinal en bovinos de carne: “Enfoque bioecológico para un control integrado y sustentable” 2015. Programa Sustentable para el Control de las Infecciones Parasitarias, Cuadernillo Técnico N° 16, Serie del Instituto de Promoción de la Carne Vacuna (IPCVA) 32 p.

García Ruiz A, Ruíz López F, Alonso Díaz M, von Son de Fernex E, Olazarán Jenkins S, Vega Murillo V, López Arellano M. Estudio de asociación genómica para resistencia a *Cooperia punctata* en bovinos cruzados en el trópico subhúmedo de México. *Rev Mex Cienc Pec* 2019; 10: 482-489.

Gasbarre Louis. Anthelmintic resistance in cattle nematodes en US. *Vet Parasitol* 2014; 204: 3-11.

aGasbarre LC, Smith LL, Hoberg E, Pilitt PA. Further characterization of a cattle nematode population with demonstrated resistance to current anthelmintics. *Vet Parasitol* 2009; 166: 275-280.

bGasbarre LC, Smith LL, Lichtenfels JR, Pilitt PA. The identification of cattle nematode parasites resistant to multiple classes of anthelmintics in a commercial cattle population in the US. *Vet Parasitol* 2009; 281-285.

Gasser RB, Schwarz EM, Korhonen PK, Young ND. Understanding *Haemonchus contortus* better through genomics and transcriptomics. *Adv Parasitol* 2016; 93: 519-567.

Geary TG, Sakanari JA, Caffrey CR. Anthelmintic drug discovery: into the future. *J Parasitol* 2015; 101: 125-133.

Gibbons Lynda M. Revision of the african species of the genus *Cooperia* Ransom, 1907 (nematoda, Trichostrongylidae). *Sist Parasitol* 1981; 2: 219-252.

Guang-Lu L, Yang H, Xiao-Huic C, Gao-Xue W, Fei L. Synthesis and anthelmintic activity of coumarin-imidazole hybrid derivatives against *Dactylogyrus intermedius* in goldfish. *Bioorganic Med Chem Lett* 2016; 26: 5039-5043.

Guzansky F, Martins L, Malavazi-de Christo M, de-Oliveira J, Romero-da Silva A, Lamas-de Araujo M, Coutinho D, Fronza M, Cunegundes MC, Scherer R. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of gold nanoparticles capped with quercetin. *Saudi Pharm J* 2019; articulo en prensa.

Heckler RP, Almeida GD, Santos LB, Borges DGL, Neves JPL, Onizuka MKV, Borges FA. P-gp modulating drugs greatly potentiate the *in vitro* effect of ivermectin against resistant larvae of *Haemonchus placei*. *Vet Parasitol* 2014; 205: 638-645.

Herrera BF. 2005. Anexo estadístico del 1er informe de gobierno 2005; desarrollo agropecuario, Gobierno del Estado de Veracruz de Ignacio de la Llave, Xalapa, pp. 239-290.

Hoste H, Torres JF, Alonso MA, Brunet S, Sandoval C, Houzangbe S. Identification and validation of bioactive plants for the control of gastrointestinal nematodes in small ruminants. *Vet Parasitol* 2008; 25: 56-72.

Hoste H, Martinez-Ortiz-De-Montellano C, Manolaraki F, Brunet S, Ojeda-Robertos N, Fourquaux I, Torres-Acosta JF, Sandoval-Castro CA. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Veht Parasitol* 2012; 186: 18-27.

İlyasoğlu H, Nadzieja M, Guo Z. Caffeic acid grafted chitosan as a novel dual-functional stabilizer for food-grade emulsions and additive antioxidant property. *Food Hydrocolloids* 2019; 95: 168-176.

INEGI. Encuesta Nacional Agropecuaria 2017. Disponible en: https://www.inegi.org.mx/contenidos/programas/ena/2017/doc/ena2017_pres.pdf

Jackson F, Miller J. Alternative approaches to control-Quo vadit?. *Vet Parasitol.* 2006; 139: 371-384.

Jarillo J, Valles-de la Mora B, Castillo E, Ramírez y Avilés L. Efecto de la carga animal sobre características del suelo y de la vegetación en un pastizal nativo del trópico húmedo de Veracruz, México. *Trop Subtrop Agroecos* 2010; 12: 373-388.

Jin U, Song K, Motomura M, Suzuki I, Gu Y, Kang Y, Moon T, Kim C. Caffeic acid phenethyl ester induces mitochondria-mediated apoptosis in human myeloid leukemia U937 cells. *Mol Cell Biochem* 2008; 310: 43-48.

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

Kier WM. The diversity of hydrostatic skeletons. *J Experim Bio* 2012; 215: 1247-1257.

Klongsiriwet C, Quijada J, Williams AR, Mueller-Harvey I, Williamson E, Hoste H. Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. *Internat Jour Parasitol: Drugs Drugs Resist.* 2015; 5: 127-134.

Komuniecki RW, Hobson RJ, Rex EB, Hapiak VM, Komuniecki PR. Biogenic amine receptors in parasitic nematodes: what can be learned from *Caenorhabditis elegans*?. *Mol Biochem Parasitol* 2004; 137: 1-11.

Koppel R., E.T., G.A. Ortíz O., A. Ávila D., J. Lagunes L., O.G. Castañeda M., I. López G., U. Aguilar B., H. Román P., J.A. Villagómez C., R. Aguilera S., J. Quiroz V., R.C. Calderón R. 2002. Manejo de ganado bovino de doble propósito en el trópico. INIFAP. CIRGOC. Libro Técnico Núm. 5. Segunda edición. Veracruz. México. 161 p.

Kozan E, Arabaci S, Irem I. *In vitro* anthelmintic effect of *Vicia pannonica* var. *purpurascens* on trichostrongylosis in sheep. *Exp Parasitol* 2013; 299-303.

Lanusse C, Canton C, Virkel G, Alvarez L, Costa-Junior L, Lifschitz A. Strategies to optimize the efficacy of anthelmintic drugs in ruminants. *Trends Parasitol* 2018; 34: 664-682.

Lee DL. The biology of nematode. Reino Unido: informa; 2002.

Lespine A, Ménez C, Bourguinat C, Prichard R. P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: Prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. *Int J Parasitol: Drugs Drugs Resist* 2012; 2: 58-75.

Lima S. Seasonal infection pattern of gastrointestinal nematodes of beef cattle in Minas Gerais State-Brazil. *Vet Parasitol* 1998; 74: 203-214.

Lopes-Torres EJ, de-Souza W, Miranda K. Comparative analysis of *Trichuris muris* surface using conventional, low vacuum, environmental and field emission scanning electron microscopy. *Vet Parasitol* 2013; 196: 409-416.

Louvandini H, Rodrigues RR, Gennari SM, McManus CM, Vitti DMSS. Phosphorus kinetics in calves experimentally submitted to a trickle infection with *Cooperia punctata*. *Vet Parasitol* 2009; 163: 47-51.

Lukovich Ratko. Identificación de las formas adultas de los nematodos gastrointestinales y pulmonares de los ruminantes en la República de Argentina. Red de Helminología de FAO para América Latina y el Caribe. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria 2011; 1-33

Magaña-Monforte J, Ríos-Arjona G, Martínez-Gonzales J. Dual purpose cattle production systems and the challenges of the tropics of Mexico. *Archiv latinoam produc anim* 2006; 14: 105-114.

Magnani C, Pires R, Lourenço I, Borges VL, Nunes HR, Antonio M. *In vitro* methods to determine the antioxidant activity of caffeic acid. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc* 2019; 219: 358-366.

Mayoral-Peña Z, Piña DM, Gómez M, Salazar LA, Aguilar G, Arellano F. El nematodo *Caenorhabditis elegans* como modelo para evaluar el potencial antihelmíntico de extractos de plantas. *Rev Mex Cienc Pecu* 2017; 8: 279-289.

Márquez-Lara D. Resistencia a los antihelmínticos: origen, desarrollo y control. *Rev Carp* 2003; 4: 56-70.

Martínez-Castro JC, Cotera J, Abad J. Características de la producción y comercialización de leche bovina en sistemas de doble propósito en Dobladero, Veracruz. *Rev Mex Agroneg* 2012; 30: 816-824.

Martínez-Ortiz-de-Montellano C, Arroyo-López C, Fourquaux I, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Hoste H. Scanning electron microscopy of *Haemonchus contortus* exposed to tannin-rich plants under *in vivo* and *in vitro* conditions. *Exp Parasitol* 2013; 133: 281-286.

Martínez-Ortiz-de-Montellano C, Torres-Acosta JF, Fourquaux I, Sandoval-Castro CA, Hoste H. Ultrastructural study of adult *Haemonchus contortus* exposed to polyphenol-rich materials under *in vivo* conditions in goats. *Parasite* 2019; 26: 2-7

Matershka M. Quercetin and its derivatives: chemical structure and bioactivity-a review. Pol J Food Nutr Sci 2008; 58: 407-413.

Mayoral-Peña Z, Piña DM, Gómez M, Salazar LA, Aguilar G, Arellano F. El nematodo *Caenorhabditis elegans* como modelo para evaluar el potencial antihelmíntico de extractos de plantas. Rev Mex Cienc Pecu 2017; 8: 279-289.

Menezes JCJMDS, Diederich M. Natural dimers of coumarin, chalcones, and resveratrol and the link between structure and pharmacology. Eur J Med Chem 2019; 182: 1-16.

Mengitsu G, Hoste H, Karonen M, Salminen JP, Hendriks WH, Pellikaan WF. The *in vitro* anthelmintic properties of browse plant species against *Haemonchus contortus* is determined by the polyphenol content and composition. Vet Parasitol 2017; 237: 110-116.

Mercado-Mercado G, de-la-Rosa-Carrillo L, Wall-Medina A, López-Díaz JA, Álvarez-Parrilla E, Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especies típicas consumidas en México. Nutr Hosp 2013; 28: 36-46.

Miranda-Saksena M, Boadle RA, Cunningham AL. Preparation of Herpes Simplex Virus-Infected Primary Neurons for Trasmision Electron Microscopy. Spring Nat 2019; 2060: 343-354.

Muchiut SM, Fernández AS, Steffan PE, Riva E, Fiel CA. Anthelmintic resistance: Management of parasite refugia for *Haemonchus contortus* through the replacement of resistant with susceptible populations. Vet Parasitol 2018; 254: 43-48.

Muñiz-Lagunes A, González-Garduño R, López-Arellano ME, Ramírez-Valverde R, Ruíz-Flores A, García-Muñiz G, Ramírez-Vargas G, Medoza-de-Gives P, Torres-Hernández G. Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes from grazing beef cattle in Campeche State, Mexico. Trop Anim Health Prod 2015; 47: 1049-1054.

Narayanaswamy VK, Gleiser, RM, Ksumbwe K, Aldhubiab BE, Attimarad MV, Odhav B. Evaluation of halogenated coumarins for antimosquito properties. *Sci World J* 2014; ID 189824: 1-7.

National Center for Biotechnology Information. Base de datos PubChem. Rutin, CID=5280805, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rutin> (citado Sep 12, 2019).

Orantes-Zebadúa MA, Platas-Rosado D, Córdova-Avalos V, de los Santos-Lara MC, Córdova-Avalos A. Caracterización de la ganadería de doble propósito en una región de Chiapas, México. *Ecosis recur agropec* 2014; 1:49-58.

Page AP, Stepek G, Winter AD, Pertab D. Enzymology of the nematode cuticle: A potential drug target?. *Int J Parasitol: Drug Drug Resis* 2014; 4: 133-141.

Peña-Espinoza M, Williams AR, Thamsborg SM, Simonsen HT, Enemark HL. Anthelmintic effects of forage chicory (*Cichorium intybus*) against free-living and parasitic stages of *Cooperia oncophora*. *Vet Parasitol* 2017; 243: 204-207.

Pereira CAJ, Oliveira LLS, Coaglio AL, Santos FSO, Cezar RMS, Mendes T, Oliveira FLP, Conzensa G, Lima WS. Anti-helminthic activity of *Momordica charantia* L. against *Fasciola hepatica* eggs after twelve days of incubation *in vitro*. *Vet Parasitol* 2016; 228: 160-166.

Perri AF, Mejia ME, Licoff N, Lazaro L, Miglierina M, Ornstein A, Becu-Villalobos D, Lacau-Mengido IM. Gastrointestinal parasites presence during the peripartum decreases total milk production in grazing dairy Holstein cows. *Vet Parasitol* 2011; 178: 311-318.

Petrova E. Innovation in the pharmaceutical industry: the process of drug discovery and development. Nueva York: Springer; 2014.

Petzold B, Park S, Ponce P, Roozeboom C, Powell C, Goodman M, Pruitt B. *Caenorhabditis elegans* body mechanics are regulated by body wall muscle tone. *Biophys J* 2011; 100: 1977-1985.

Poumale HM, Hamm R, Zang Y, Shiono Y, Kuete V. Coumarins and related compounds from the medicinal plants of Africa. *Med Pl Res Afr* 2013; 8: 262-300.

Quiroz Romero H. *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos*. México: Limusa; 2005.

Quiroz H, Chavarría B, Hernández A, Ochoa P, Cruz J, Cruz I. Efecto de una nueva formulación de ivermectina + abamectina de larga duración contra nematodos gastrointestinales y la diferencia en ganancia de peso en bovinos. *Vet Mex* 2009; 40: 157-165.

Rabel R, Mcgregor PG, Douch C. Improved bioassay for estimation of inhibitory effects of ovine gastrointestinal mucus and anthelmintics on nematode larval migration. *Int J for Parasitol*. 1994; 24: 671-676.

Raghavendra P, Pullaiah T. Biomedical imaging role in cellular and molecular diagnostics. *Adv Cell Mol Diag* 2018: 85-111.

Ramünke S, de Almeida-Borges F, von Son-de Fernex E, von Samson-Himmelstjerna G, Krücken J. Molecular marker sequences of cattle *Cooperia* species identify *Cooperia spatulata* as a morphotype of *Cooperia punctata*. *Plos one* 2018; 13: 1-21.

Rodriguez IR, Grisi L, Pérez-de León AA, Silva H, Torres JFJ, Fragoso H, Romero D, Rosario R, Saldiema F, García D. Potential economic impact assessment for cattle parasites en Mexico. Review. *Rev Mex Cienc Pecu* 2017; 8: 61-74.

Rojo R, Vázquez JF, Pérez P, Mendoza GD, Salem AZM, Albarrán B, González A, Hernández J, Rebollar S, Cardoso D, Dorantes EJ, Gutierrez JG. Dual purpose cattle production in Mexico. *Trop Anim Health Prod* 2009; 41: 715-721.

Sandoval CA, Torres JFJ, Hoste H, Salem AZM, Chan JI. Using plant bioactive materials to control gastrointestinal tract helminths in livestock. *Anim Feed Sci Tech* 2012; 176: 192-201.

Scott I, Pomroy WE, Kenyon PR, Smith G, Adlington B, Moss A. Lack of efficacy of monopantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus columbriformis*. *Vet Parasitol* 2013; 198: 166-171.

SEFIPLAN. Sistema de información municipal: cuadernillos municipales, 2016. Disponible en: <http://ceieg.veracruz.gob.mx/wp-content/uploads/sites/21/2016/05/Tlapacoyan.pdf>

Selkirk ME, Lazari O, Matthews B. Functional genomics of nematode acetylcholinesterases. *Parasitol* 2005; 131: 3-18.

Sepúlveda-Vázquez J, Torres-Acosta JF, Sandoval-Castro CA, Martínez-Puc JF, Chan-Pérez JI. La importancia de los metabolitos secundarios en el control de nematodos gastrointestinales en ovinos con énfasis en Yucatán, México. *J Selva Andina Anim Sci* 2018; 5: 79-95.

SIAP, 2018. La ganadería: símbolo de fortaleza del campo mexicano. Disponible en: <https://www.gob.mx/siap/articulos/la-ganaderia-simbolo-de-fortaleza-del-campo-mexicano>

Steffan P, Fiel C, Ferreyra D. Endoparasitosis mas frecuentes d elos ruminates en sistemas pastoriles de producción. Instituto de promoción de la carne vacuna Argentina, 2012.

Stromberg B, Gasbarre L, Waite A, Bechtol D, Brown M, Robinson N, Olson E, Newcomb H. *Cooperia punctata*: Effect on cattle productivity. Vet Parasitol 2012; 183: 284-291.

Szwajgier D. Anticholinesterase activity of selected phenolic acids and flavonoids-interaction testing in model solutions. Ann Agric Environ Med 2015; 22: 690-694.

Tang CY, Yang Z. Transmission Electron Microscopy (TEM). Memb Charact 2017; 8: 145-158.

Tavares-da Silva ML, Sardinha MA, Singh J, de-Mesquita MF. Beneficial uses of cinnamon in health and diseases: an interdisciplinary approach. T Rol Func Food Sec Glob Heal 2019; 33: 565-576.

Taylor MA, Coops RL y Wall RL. Veterinary Parasitology. Reino Unido: Wiley Blackwell; 2016.

Torres-Acosta, Hoste H. Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. Small Rumin Resear 2008; 77: 159-173.

Torres-Vásquez P, Prada-Sanmiguel GA, Márquez-Lara. Resistencia antihelmíntica en los nematodos gastrointestinales del bovino. Rev Med Vet 2007; 13: 59-76.

Urdaneta Fátima. Mejoramiento de la eficiencia productiva de los sistemas de ganadería bovina de doble propósito (*Taurus-Indicus*). Arch Latinoam Prod Anim 2009; 17: 109-120.

van-Wik JA y Mayhew E. Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide. Onderstep J Vet Res; 2013; 80: 1-14.

Vázquez-Nin G., Echeverría O. Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas. México: Fondo de Cultura Económica; 2002.

Vilaboa-Arroniz, J, Díaz-Rivera P, Ruiz-Rosado O, Platas-Rosad DE, González-Muñoz S, Juárez-Lagunes F, Caracterización socioeconómica y tecnológica de los agroecosistemas con bovinos de doble propósito de la región del Papaloapan, Veracruz, México. Trop Subtrop Agroecos 2009; 10: 53-62.

Vilaboa Arroniz Julio y Díaz Rivera Pablo. Caracterización socioeconómica y tecnológica de los sistemas ganaderos en siete municipios del estado de Veracruz, México. Zootecn Trop 2009; 27: 427-436.

Villa Mancera A y Reynoso Palomar A. Prevalence, economic assessment and risk factors of gastrointestinal nematodes infecting herds in tropical, dry and temperate climate regions in Mexico. Microb Pathogen 2019; 129: 50-55.

Venugopala KN, Rashmi V, Odhav B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. BioMed Res. Int 2013; 2013: 1-14.

von-Son de Fernex E, Alonso Díaz M, Valles de la Mora B, Capetillo Leal C. *In vitro* anthelmintic activity of five tropical legumes on the exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. Exper Parasitol 2012; 131: 413-418.

von-Son-de Fernex E, Alonso MA, Mendoza P, Valles-de la Mora B, González M, Zamilpa A, Castillo E. Elucidation of *Leucaena leucocephala* anthelmintic-like phytochemicals and the ultrastructural damage generated to eggs of *Cooperia spp.* Vet Parasitol 2015; 214: 80-95.

von-Son-de Fernex E. Evaluación in vitro e in vivo de plantas bioactivas sobre el control de *Cooperia punctata* en bovinos. [Tesis de doctorado]. Ciudad de México (Mex.): Universidad Nacional Autónoma de México; 2016.

von-Son-de- Fernex E, Alonso-Díaz MA, Valles-de la Mora B, Mendoza-de Gives P, González-Cortazar M, Zamilpa A. Anthelmintic effect of 2H-chromen-2-one isolated from *Gliricidia sepium* against *Cooperia punctata*. *Exp Parasitol* 2017; 178: 1-6.

Waghorn G. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production progress and challenges. *Anim Feed Sci Techn* 2008; 147: 116-139.

Wharton David. A functional biology of nematodes. Nueva Zelanda: Croom Helm London & Sydney; 1986.

Webb J, Holgate JH. Scanning Electron Microscopy. *Microsc* 2003: 3922-3928.

Wenzel M, Dekker M, Wang B, Burggraaf M, Bitter W, van-Weering J, Hamoen L. New flat embedding method for transmission electron microscopy reveals an unknown mechanism of tetracycline. *Articulo en prensa*.

Wojdylo A, Oszmianski J, Czemerys R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem* 2007; 105: 940-949.

Yang L, Wen K, Ruan X, Zhao Y, Wei F, Wang Q. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules* 2018; 23: 2-26.