



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**

EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO
ANTIHELMÍNTICO DE LA NAFTOQUINONA
LLVDRMC SOBRE LARVAS DE *Haemonchus*
contortus

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

Melodía Rubí Castro Pérez

Asesor:

MVZ. Dr. Víctor Hugo Del Río Araiza



Ciudad Universitaria, CD.MX.

2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIA

Con mucho amor a mis padres Alicia Rosario Pérez Calderón y José Antonio Castro Baños por el enorme apoyo, paciencia y cariño que me han dado. Sin ustedes nunca habría podido llegar hasta aquí y por eso les estoy infinitamente agradecida. Todos mis logros son y siempre serán suyos.

A mi hermana, Alicia Mariana Penélope Castro Pérez, por ser la estrella más brillante en mi camino. Eres mi principal motivación para seguir adelante. Te admiro y respeto, pero sobre todo te amo muchísimo. Gracias por toda tu confianza, fe y ayuda.

A mis abuelos Graciela Baños Téllez y Antonio Castro Luna por desearme siempre lo mejor y confiar en mis conocimientos. Los aprecio mucho.

A mi mejor amiga Ana Luisa Cordero Domingo por tu amistad incondicional durante más de veinte años. Si hay algo que debo agradecerle al universo es haberte conocido. Has estado para mí en momentos difíciles y también me has colmado de felicidad. Eres la mejor y espero que nuestra amistad continúe muchas décadas más.

A mi amiga Ximena Gómez Mata por nunca juzgarme y siempre estar a mi lado. Me has apoyado incluso cuando yo no lo hacía y por eso te tengo eternamente en mi corazón.

A Hydra que nos dejó hace diez años por haberme motivado a iniciar esta carrera. Te tengo presente todos los días y te extraño.

A Limón, Haru y Rayita por acompañarme en la escritura de este proyecto con sus ronroneos y maullidos. Los amo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Víctor Hugo del Río Araiza por su apoyo, paciencia y tiempo para realizar esta investigación.

Al Dr. Fernando Alba Hurtado por facilitarme las larvas 3 de *Haemonchus contortus* y permitirme realizar pruebas en su laboratorio.

Al Dr. César Cuenca Verde por todo el conocimiento que me transmitió para poder realizar los experimentos con *Haemonchus contortus*.

Al Dr. Jorge Morales Montor y a la Dra. Lluvia López López por proporcionar la naftoquinona para realizar los experimentos.

Al proyecto IA207023 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), y al proyecto PE205723 del Programa de Apoyo a Proyectos para Innovar y Mejorar la Educación (PAPIME) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) otorgados al Dr. Víctor Hugo del Río Araiza por facilitar los recursos para realizar este trabajo de tesis.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. Generalidades de la Hemoncosis	2
2. Clasificación taxonómica	2
3. Morfología	5
3.1 Huevos	5
3.2 Larvas	5
3.3 Adultos	6
4. Ciclo biológico	7
5. Patogenia y lesiones	11
6. Signos clínicos	14
7. Diagnóstico	15
8. Tratamiento y resistencia antihelmíntica	17
8.1 Alternativas para el control de <i>H. contortus</i>	19
9. Naftoquinonas	22
9.1 Mecanismo de acción	23
9.2 Actividad antiparasitaria	26
JUSTIFICACIÓN	28
HIPÓTESIS	28
OBEJTIVO GENERAL	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
MATERIAL Y MÉTODOS	29

1. Declaración de ética	29
2. Obtención de L3 de <i>H. contortus</i>	29
3. Lavado de L3 de <i>H. contortus</i>	29
4. Proceso de obtención de L3 desenvainadas	30
5. Preparación de las soluciones stock de la naftoquinona LLVDRMC	30
6. Curvas concentración-respuesta y tiempo-respuesta para evaluar el efecto de la naftoquinona LLVDRMC	31
7. Análisis estadístico	31
RESULTADOS	32
1. Efecto de la naftoquinona LLVDRMC sobre la muda de las L3 desenvainadas de <i>H. contortus</i> .	32
2. Efecto de la naftoquinona LLVDRMC sobre la motilidad de las L3 desenvainadas de <i>H. contortus</i> .	33
3. Efecto de la naftoquinona LLVDRMC sobre la viabilidad de las L3 desenvainadas de <i>H. contortus</i>	34
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIONES	39
REFERENCIAS	40

RESUMEN

CASTRO PÉREZ MELODÍA RUBÍ. Evaluación *in vitro* del efecto antihelmíntico de la naftoquinona LLVDRMC sobre larvas de *Haemonchus contortus* (Asesor: Dr. Víctor Hugo del Río Araiza)

Haemonchus contortus es un parásito de importancia en medicina veterinaria que ha desarrollado resistencia a los antihelmínticos convencionales. Las naftoquinonas han demostrado previamente actividad antiparasitaria, por lo que se evaluó el efecto *in vitro* antihelmíntico de la naftoquinona LLVDRMC, buscando alternativas a los tratamientos actuales. Para este proceso, las larvas fueron lavadas, desenvainadas y posteriormente incubadas con distintas concentraciones de la naftoquinona (25, 50, 75 y 100 µg/ml). También se colocó un grupo control, un vehículo y un control positivo tratado con ivermectina. En cada condición se colocaron 300 larvas 3 (L3) de *Haemonchus contortus*. La incubación se llevó a cabo por 5 días a 37°C y 5% CO₂ y las lecturas se realizaron a las 24, 48, 72, 96 y 120 hrs. En cada día se evaluó la muda, la motilidad y la viabilidad larvaria. En los resultados, se encontró una disminución en la viabilidad estadísticamente significativa ($P < 0.001$) a partir de las 72 hrs entre los grupos de naftoquinona a 75 y 100 µg/ml con respecto al control. De igual forma, a partir de las 72 hrs, se halló una disminución en la motilidad estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre el grupo con 100 µg/ml de naftoquinona y el grupo control. No hubo cambios en la muda del nematodo en ninguna condición. Se concluye que la naftoquinona LLVDRMC tiene un efecto directo sobre la L3 de *Haemonchus contortus* afectando su motilidad y viabilidad, pero no tiene efectos sobre la muda del parásito.

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades de la Hemoncosis

La infección por el nematodo *Haemonchus contortus* (*H. contortus*) (Rudolphi, 1803), también conocida como Hemoncosis, es una enfermedad de importancia mundial por su impacto en la producción pecuaria, ya que afecta la ganancia de peso de los rumiantes y su producción láctea o cárnica según corresponda (en los ovinos también afecta la cantidad y calidad de la lana) (1). En casos hiperagudos, los animales pueden incluso morir de una gastritis hemorrágica (2), siendo aún peor la pérdida económica. No obstante, la presentación aguda y crónica de la enfermedad también afecta de manera significativa. La primera no sólo por las pérdidas en conversión alimenticia, sino también por la frecuencia con la que acontecen altas mortalidades en animales jóvenes (3). En cuanto a la segunda, esta mantiene una pérdida de peso progresiva y debilidad que inicialmente pueden pasar inadvertidas ante el productor (forma subclínica), de tal manera que, la causa de los daños podría continuarse durante un largo período de tiempo antes de ser reconocida.

Cabe mencionar, que todas las clases de rumiantes son susceptibles, sin embargo, se ha observado una interacción más agresiva en ovinos y caprinos (4)

Dentro de México, este parásito tiene las condiciones ambientales idóneas (climas tropicales y subtropicales) que necesita para desarrollarse óptimamente, por lo que es el nemátodo gastrointestinal con mayor prevalencia e impacto en el país (5)

2. Clasificación taxonómica

H. contortus, comúnmente conocido como “gusano palo de barbería”, es un parásito hematófago de la Superfamilia Trichostrongyloidea, recientemente clasificado en la familia Haemonchidae (antes se encontraba en Trichostrongylidae) (4,6,7). Es un gusano cilíndrico estrechado anteriormente, de color blanquecino con apariencia rojiza (debido a la sangre que ingiere) y una cavidad oral pequeña. El macho adulto tiene una bolsa copuladora lobulada en el extremo posterior, un gobernáculo y un par de espículas en forma de aguja para el apareamiento, mientras que la hembra tiene la vulva en la parte terminal (4).

En general, estos parásitos son fáciles de distinguir por su localización abomasal y su tamaño (2 a 3 cm) (2). No obstante, para distinguir entre especies se toman en cuenta factores más específicos que incluyen características estructurales típicas de machos y hembras (8). De esta manera, se pueden utilizar caracteres como la configuración de las espículas y la bursa en machos, y el “sinlofo” (sistema de crestas cuticulares visibles en la superficie de la mayoría de los nematodos trichostrongiloides) en machos y hembras (8).

Actualmente, se tiene conocimiento de 12 especies dentro del género *Haemonchus*, de las cuales, *H. contortus*, *H. placei*, *H. similis* y *H. longistipes*, son los más comunes en rumiantes domésticos (Tabla 1 y 2) (8).

Reino Animal

Phylum Nematoda

Clase Chromadorea

Orden Strongylida

Superfamilia Trichostrongyloidea

Familia Haemonchidae

Subfamilia Haemonchinae

Género *Haemonchus*

Especie *contortus*

Especies dentro del género <i>Haemonchus</i> que afectan rumiantes domésticos			
Nombre	Hospederos	Órgano blanco	Distribución geográfica
<i>Haemonchus contortus</i>	Borregos, cabras, camellos, ciervos y llamas	Abomaso	Todo el mundo; con mayor importancia en zonas tropicales y subtropicales
<i>Haemonchus similis</i>	Vacas y ciervos	Abomaso	Norteamérica y Europa
<i>Haemonchus longistipes</i>	Camellos y borregos (rara vez bovinos)	Abomaso	Amplia distribución, desde África hasta el sur de Eurasia (mayor importancia en zonas tropicales y subtropicales)

Tabla 1. Especies dentro del género *Haemonchus* que afectan rumiantes domésticos (Modificado de: Taylor, et al. 2016) (2).

Otras especies de <i>Haemonchus</i>	
Nombre	Autor
<i>Haemonchus bedfordi</i>	Le Roux, 1929
<i>Haemonchus dinniki</i>	Sachs, Gibbons y Lweno, 1973
<i>Haemonchus horaki</i>	Lichtenfels, Pilitt, Gibbons y Boomker, 2001
<i>Haemonchus Krugeri</i>	Ortlepp, 1964
<i>Haemonchus lawrencei</i>	Sandground, 1933
<i>Haemonchus mitchelli</i>	Le Roux, 1929
<i>Haemonchus vegliai</i>	Le Roux, 1929
<i>Haemonchus okapiae</i>	van den Berghe, 1937

Tabla 2. Otras especies dentro del género *Haemonchus*. Fuente: Zarlenga. Et al 2004. En el caso de *H. bedfordi*, *H. dinniki*, *H. horaki*, *H. krugeri*, *H. lawrencei*, *H. mitchelli* y *H. vegliai*,

estos son parásitos principales de especies de bovinos, antílopes, redecinos, impalas, alcelafinos y caprinos silvestres en África subsahariana. *H. okapiae*, en cambio, sólo parasita miembros de la familia Giraffidae (jirafas y okapis) (8)

3. Morfología

Dentro de las fases del ciclo biológico de *H. contortus* que se pueden reconocer y observar tenemos; la fase de huevo (blastomerado o larvado), larvas (5 estadios larvales) y adultos (machos y hembras con dimorfismo sexual). Cada uno de ellos posee ciertas características morfológicas (a excepción del huevo blastomerado), que nos van a ayudar a identificarlos y diferenciarlos de otros nematodos gastrointestinales.

3.1 Huevos

Los huevos miden, en promedio, 70-79 μ x 45-49 μ (4) y tienen forma elíptica, con paredes laterales en forma de barril y polos anchos aplanados (2) Su capa quitinosa es delgada, lisa y ligeramente amarillenta. En la parte interna, se encuentran varios blastómeros que llenan el volumen total de los huevos casi por completo, pero que son difíciles de distinguir individualmente (2) (Figura 1A).

3.2 Larvas

La larva de estadio 1 (L1), mide en promedio 369 μ de longitud y su estructura es muy simple, con un esófago Rhabditiforme (similar al nemátodo del género *Rhabditis* con ensanchaciones anteriores y posteriores), y una simple cavidad bucal (8) La larva de estadio 2 (L2), por otro lado, es muy similar a la L1, con la diferencia de que es más grande (8). Diferencias mayores se observan con la larva infectante del parásito, la larva en estadio 3 (L3), que mide aproximadamente 690 μ . Tiene la cabeza estrecha y redondeada, y posee 16 células intestinales (2). Su segmento posterior termina en forma cónica y está cubierta por completo de una cutícula o vaina que proviene de la etapa anterior (8) (Figura 1B). La L4 posee una cápsula bucal más desarrollada (en forma de cono invertido y con un par de estructuras o piezas bucales) y un segmento posterior asimétrico con una curvatura dorsal. Su tamaño puede variar alrededor de las 950 μ de longitud (Figura 1 C, D) (9,10)

3.3 Adultos

Los adultos de *H. contortus* miden de 2 a 3cm (los machos de 10-22mm, mientras que las hembras de 20-30mm aproximadamente) (2). A nivel macroscópico, se pueden distinguir los ovarios blancos de las hembras, enrollados en espiral alrededor del intestino repleto de sangre, dando una apariencia de “palo de barbería” (2). En cambio, a nivel microscópico se puede observar la Bolsa copuladora masculina y el útero y la vulva de las hembras. La vulva está localizada al comienzo del tercio posterior del cuerpo y puede ser de tres tipos: lisa, nudosa y lingüiforme, de acuerdo con la forma del colgajo cuticular que la protege (2,8,11). Por otro lado, la bolsa copuladora del macho es trilobulada teniendo dos lóbulos laterales grandes y uno dorsal, pequeño y asimétrico (2,12). Asimismo, se visualizan las dos espículas del macho con una púa en el extremo distal, las cuales se insertan en la abertura genital femenina durante la cópula (2,12) (Figura 1 E, F).

Es importante mencionar, que la bolsa copuladora se deriva de alas caudales (expansiones de cutícula aplanadas y en forma de ala en la región posterior), que, a su vez, están sostenidas por papilas muy alargadas conocidas como “rayos bursales” (2). En el caso de *H. contortus*, el rayo bursal dorsal es asimétrico y bifurcado, mientras que los laterales surgen de un tronco común, los ventrales se unen en su parte proximal y los rayos externos dorsales se encuentran largos y muy delgados (12) (Figura 1 E).

Por último, se debe señalar que ambos sexos poseen papilas cervicales y una cavidad bucal pequeña con un diente sobresaliente que se extiende desde la pared dorsal para succionar sangre del abomaso del hospedero (2,12)

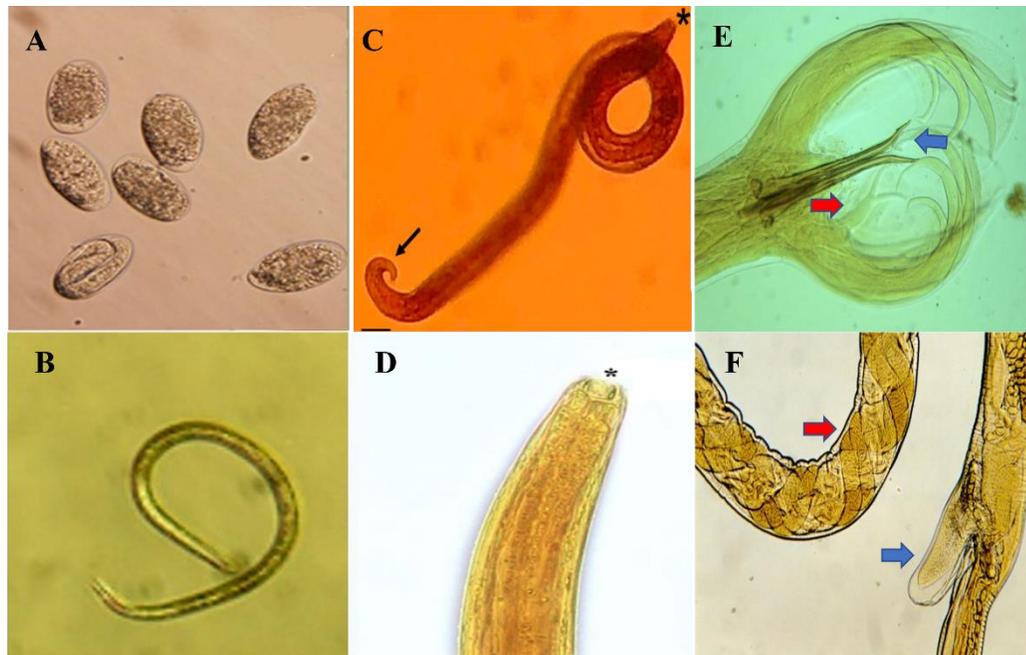


Figura 1. Morfología de las fases del ciclo biológico de *H. contortus*. A) Huevo de *H. contortus*. Fuente: Naeem M *et. al.* 2020 (4). B) Larva 3 de *H. contortus*. Foto de autoría propia. C) Larva 4 de *H. contortus*; el asterisco señala la cápsula bucal y la flecha indica la curvatura dorsal de la cola. Fuente: Niciura SCM *et. al.* 2023 (9). D) Larva 4 de *H. contortus*; el asterisco señala la cápsula bucal desarrollada. Fuente: Gutiérrez-Amézquita *et. al.* 2017 (10). E) Bolsa copuladora del macho adulto de *H. contortus*; La flecha azul señala las espículas, la flecha roja señala el rayo dorsal bifurcado en forma de “Y”. Fuente: Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, laminillas digitales, 2014. F) Hembra adulta de *H. contortus*; la flecha roja señala el entrecruzamiento del aparato reproductor y digestivo, la flecha azul señala la solapa vulvar lingüiforme. Fuente: Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, laminillas digitales, 2014.

4. Ciclo biológico

El ciclo biológico de *H. contortus* es un ciclo directo con dos fases definidas: una exógena (no parásita) y otra endógena (parásita) (8). Durante el ciclo, el parásito pasa por siete estadios biológicos: huevo, cinco fases larvarias y adultos. (4). Los adultos se encuentran en el abomaso de los hospederos definitivos (Figura 2A). La hembra es muy prolífica por lo que pone una gran cantidad de huevos (puede colocar de 5000-10 000 huevos por día), los cuales

terminan en los pastos a través de las heces (4,13) (Figura 2B). En este punto inicia la fase exógena, en la cual, los huevos que inicialmente fueron expulsados en etapa de mórula, embrionan dando lugar a larvas de estadio 1 (L1) que posteriormente eclosionan (13) (Figura 2C). La L1 se nutre de bacterias en este ambiente, para luego mudar y transformarse en larva de estadio 2 (L2) (Figura 2D), que sigue el mismo plan de alimentación (13,14) hasta convertirse en larva de estadio 3 (L3) (larva infectiva que no se alimenta pues aún tiene la cutícula de su etapa anterior) (14) (Figura 2E). Este proceso sucede en el transcurso de 5 a 7 días (2,4), pero puede retrasarse por semanas o meses si las condiciones de temperatura y humedad no son adecuadas (2). Una vez que el parásito ha llegado hasta L3 (larva que puede sobrevivir de 1 a 3 meses en la pastura o las heces) (2), esta se vuelve muy activa; deja las heces y sube a la hierba mojada, que sirve de alimento a los rumiantes (13,15) (Figura 2F). Posteriormente, la L3 es ingerida por un hospedero, iniciando la fase endógena del ciclo (Figura 2G). En el rumen, la larva secreta una enzima conocida como leucinoamino-peptidasa, que incrementa el pH ruminal y permite su desenvaine. (15) A continuación, la larva ingresa en el abomaso e invade las criptas de las glándulas gástricas, donde muda y se convierte en una larva de estadio 4 (L4), capaz de dañar el tejido y alimentarse de sangre (13). Más adelante, pasa a la mucosa abomasal para después abandonarla y alojarse en lumen abomasal, donde muda una vez más convirtiéndose en una larva de estadio 5 (L5) o pre-adulto, el cual madura directamente sin más mudas hasta volverse un nemátodo adulto macho o hembra sexualmente maduro (5) (Figura 2H).

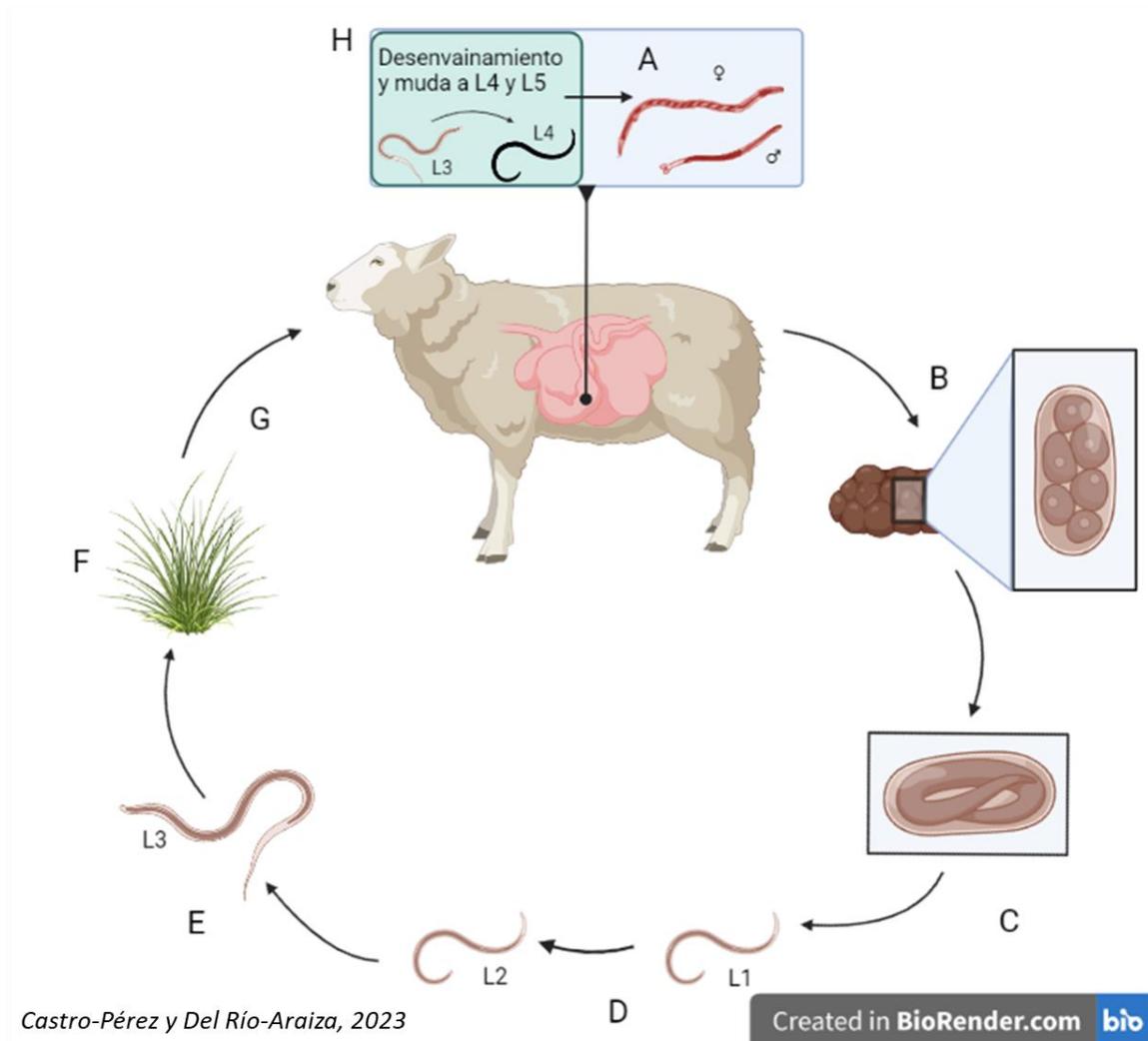


Figura 2. Ciclo biológico de *H. contortus*. A) Adultos de *H. contortus* en abomaso, hembra y macho respectivamente, se reproducen, logrando una gran cantidad de huevos. B) Huevos en fase de mórula en las heces. C) Huevos embrionados. D) L1 eclosionadas que posteriormente mudan a L2. E) L3 (forma infectiva del parásito). F) L3 en el follaje húmedo. G) Ingestión de la L3 por el hospedero definitivo. H) La larva desvaina en el rumen, luego pasa al abomaso donde muda a L4, L5 y adultos. Figura creada con BioRender, Castro-Pérez y Del Río Araiza, 2023.

Cabe señalar que *H. contortus* tiene la habilidad de entrar en una etapa de desarrollo detenido o inhibido conocido como hipobiosis (13). En este proceso, un número creciente de L4 disminuye su metabolismo basal, evitando crecer y convertirse en L5. Las larvas en este estado son resistentes a los antihelmínticos y pueden pasar desapercibidas en cuanto la

población adulta de vida corta sea eliminada, ya que no se detectarán huevos en las heces y el hospedero parecerá libre de parasitosis (13).

En regiones con clima templado, el fenómeno se presenta durante el invierno, mientras que, en regiones tropicales o subtropicales como México, las condiciones de sequía después del período de lluvias provocan la hipobiosis y la mantienen hasta la siguiente temporada de lluvias (5). De esta manera, el proceso le permite a *H. contortus* esperar hasta que las condiciones sean favorables para continuar su desarrollo, madurar y ovopositar, ya que, de lo contrario, los huevos colocados perecerían en el ambiente frío/seco (2).

Aunque la hipobiosis se ha presentado en todo el mundo, su regulación sigue siendo incierta (5). Durante un estudio realizado en Kenya publicado en 1998 (16), se encontró que el inicio de la temporada de lluvias no parecía ser suficiente para la reactivación de las larvas en hipobiosis (16). Esto último se atribuyó a las diferencias entre las dos épocas de lluvia en el sitio elegido para el experimento; lluvias largas (presentes en cuatro meses) y lluvias cortas (presentes durante dos meses). Las lluvias cortas se caracterizaban por darse en tiempos breves, pero intensos y eran seguidas de un período seco. Esto último provocaba una falta de crecimiento en los pastos y por lo tanto un factor estresante para el parásito, que se mantenía en hipobiosis hasta las lluvias largas (16). Esto sugiere que la distribución de las lluvias es más importante para la reactivación del parásito, que el inicio de la temporada (16).

Por otro lado, en la actualidad, se tiene conocimiento de que la hormona progesterona puede influir en el arresto de *H. contortus*, así como la prolactina puede intervenir en su reactivación (10,17). Gutiérrez-Amézquita *et. al.* 2017 (10) demostró que la progesterona inhibe el proceso de muda de *H. contortus*, *in vitro* de L3 a L4 en una forma concentración dependiente (10). Además, detectó la presencia y posible ubicación de receptores de progesterona en las larvas. De esta forma, se relacionó el aumento de la hormona con la detención del desarrollo del parásito (10). En contraste, el aumento de prolactina ha sido vinculado al incremento de huevos excretados en las heces alrededor del parto, tanto en ovinos como caprinos (17,18). En caprinos, se comparó el conteo de huevos por gramo de heces entre cabras Angora gestantes y vacías, encontrando un mayor número en las gestantes, cuyo nivel de prolactina también era más alto (18). Esto último ha sido explicado a través del efecto inmunosupresor

de la prolactina, el cual, reduce los niveles de inmunoglobulina A (IgA) necesarios para prevenir el establecimiento del parásito a nivel intestinal (17).

5. Patogenia y lesiones

La patogenia de la infección por *H. contortus* está relacionada con la presencia de las L4 en el abomaso y con una anemia derivada de la constante succión de sangre por parte de esta y de los adultos (2,19). Para empezar, la L4 genera una hiperplasia en la glándula abomasal, una infiltración de células inflamatorias y un cambio de células productoras de ácido clorhídrico (HCl) por células jóvenes que no lo producen (19). Esto último, desencadena un incremento en el pH abomasal, que, a su vez, provoca el decremento de la activación de pepsinógeno a pepsina, reduciendo la digestión de proteínas, aumentando la permeabilidad de la mucosa e incrementando la pérdida de proteínas endógenas (19). No obstante, el daño principal ocurre cuando los helmintos se alimentan, pues conllevan a una pérdida de sangre continúa y a la formación de lesiones ulcerativas en la mucosa abomasal, agravando el síndrome digestivo, provocando dolor y anemia (4).

En adición a lo anterior, la gravedad de la pérdida de sangre depende, principalmente, del número de helmintos involucrados. Cada parásito remueve alrededor de 0.05 ml de sangre al día, entre lo que es succionado y lo que emana de las lesiones, de tal manera que, un ovino que mantiene 5,000 *H. contortus*, perderá 250ml de sangre al día (2). Es por esto que la enfermedad se clasifica en tres categorías: hiperaguda, aguda y crónica (1,2,4). En la primera, se presenta un detrimento masivo de sangre debido a la numerosa población parasitaria (cerca de 30,000 individuos), lo que ocasiona la muerte repentina de rumiantes aparentemente sanos (1,2). En la clase aguda, en cambio, la anemia se desarrolla durante un período más largo y se caracteriza por una depresión inicial del hematocrito con una falsa recuperación posterior, resultante de la eritropoyesis compensatoria (1). La médula ósea, sin embargo, siempre termina agotándose a falta de reservas de hierro y finalmente, se genera una anemia terminal que acaba con la vida del hospedero (1,2). Por último, la infección crónica por *H. contortus* se destaca por ser subclínica y pasar inadvertida, a menos de que la carga parasitaria aumente o las condiciones inmunológicas y/o nutricionales del hospedero se vean mermadas, incapacitándolo para soportar los efectos de la enfermedad. Esta categoría suele producirse en lugares donde las condiciones no son muy favorables para los estadios larvarios de vida

libre o durante períodos no óptimos (1), y no suele demostrar una anemia marcada sino más bien, pérdida de peso e inapetencia (2).

Una vez que el hospedero muere, se puede realizar una necropsia, en donde se observarán las lesiones características de la enfermedad, las cuales son: mucosa conjuntiva y oral pálidas (en varios grados, dependiendo de la etapa de infección) (Figura 3).



Figura 3. Conjuntiva ocular y oral palidecidas como consecuencia de la anemia generada por *H. contortus*. A) Color pálido de la mucosa conjuntival. B) Color pálido de la mucosa oral. Las fotos pertenecen a la necropsia de un macho cabrío de seis años que cursaba con Hemoncosis. Fuente: Cardona A, *et. al.*, 2017 (20).

También se pueden encontrar numerosos parásitos en diferentes fases de desarrollo, abomasitis ulcerativa hemorrágica, ascitis y edema submandibular (reflejo de la hipoproteinemia causada por la acción hematófaga del parásito) (1,21,22). El contenido del abomaso se distinguirá acuoso y de color marrón oscuro debido a la presencia de sangre, y la mucosa de este se hallará edematizada y cubierta de hemorragias (2,21) (Figura 4).

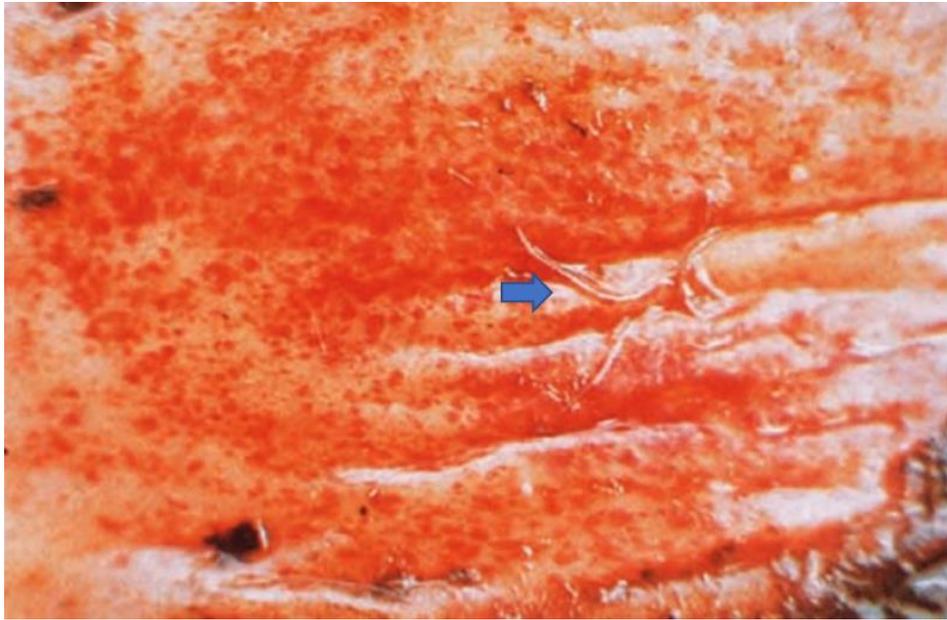


Figura 4. Abomaso obtenido a partir de un caso de Hemoncosis aguda. Se puede observar la mucosa edematosa y con presencia de distintos grados de hemorragia. La flecha azul señala la presencia de parásitos adultos. Fuente: Tomada y modificada de Taylor MA, *et. al.*, 2016 (2).

En una infección crónica, en cambio, la canal estará caquética y con sólo unos cuantos helmintos adultos presentes, aproximadamente de 100 a 1,000 (21). Es importante recordar, que en una infección hiperaguda se hallarán más de 30, 000 individuos, mientras que en una enfermedad aguda se podrán divisar entre 2,000 y 20,000 (21)

Por otro lado, los cambios histológicos asociados a una infección aguda incluyen daño traumático a la mucosa y una respuesta inmune celular (1). Se tendrán infiltrados de células mononucleares en la mucosa profunda a los siete días post-infección y a partir de los doce, estos infiltrados tendrán una extensión a la zona intersticial adyacente a las glándulas abomasales (23). Entre las células mencionadas, podemos encontrar glóbulos rojos, eosinófilos y células epiteliales en proceso de descamación o ya descamadas, dependiendo del curso de la enfermedad (23).

En el intestino delgado, los capilares experimentan congestión en la submucosa y engrosamiento de la capa muscular (22). De esta manera, se debe tomar en cuenta que el

curso de la infección y, por lo tanto, los signos clínicos, dependerán del número de parásitos presentes en el abomaso y del estado inmunológico y nutricional del hospedero.

6. Signos clínicos

Como se mencionó, la enfermedad se puede presentar de forma hiperaguda, aguda o crónica. En casos hiperagudos, los rumiantes morirán repentinamente sin signos previos de infección. No obstante, si alguno de los involucrados sobrevive, presentará la anemia típica de un caso agudo (1). Esta última se presentará a través de la palidez de las mucosas, principalmente en la mucosa conjuntival (1). Por otro lado, en la enfermedad aguda, la anemia se desarrollará poco a poco, volviéndose aparente a partir de las 2 semanas post-infección (2). En estos casos, los animales se debilitarán con el tiempo y prestarán más resistencia a moverse o permanecerán postrados más de lo normal (21). Si la enfermedad progresa, desarrollarán anemia y edema (ya sea submandibular o en forma de ascitis) (Figura 6), y si se les obliga a moverse pueden morir. Las heces de los animales afectados, por otra parte, serán firmes, escasas y oscuras (debido a la melena) (2), a menos de que el hospedero esté pasando por una infección mixta, en donde otro nematodo le pueda causar otros signos clínicos, como diarrea (21). Cabe resaltar que, en los ovinos de lana, esta puede desprenderse por hebras o incluso caerse en su totalidad (1,21).



Figura 6. Anemia conjuntival y edema submandibular que se presentan durante la infección por *H. contortus*. Cabe resaltar que otros parásitos pueden causar signos similares a los que se presenta durante la hemoncosis. Fuente: Taylor MA, *et. al.*, 2016 (2).

Finalmente, en la infección crónica, se observará pérdida de peso o pobre ganancia de este, debilidad y algún grado de anemia no muy severo (21). Asimismo, otros indicadores productivos se pueden ver afectados, como el crecimiento de la lana y la producción láctea, con la consecuente reducción de la tasa de crecimiento de los corderos y la supervivencia de estos (1,24). La exacerbación de estos signos dependerá del estado nutricional del animal, por lo cual, la infección puede continuar durante un tiempo considerable antes de que el impacto en la producción sea evidente (1).

Una de las condiciones que pueden dirigir a un rebaño a una parasitosis crónica por *H. contortus*, es el uso de fármacos poco efectivos, que no eliminan la enfermedad, pero evitan su sobreexpresión (1), o la existencia de cepas resistentes de *H. contortus*.

7. Diagnóstico

El diagnóstico de hemoncosis se puede realizar a través de varias vías, dentro de las que se encuentran: signos clínicos, método FAMACHA, identificación morfológica de huevos de nematodos en conjunto con el conteo de huevos por gramo de heces (Mc Master), hematología, técnicas moleculares e inmunológicas y hallazgos a la necropsia (4)

Dentro de los mencionados, el más utilizado en la actualidad corresponde a la identificación de huevos de nemátodo y conteo de huevos por gramo de heces. Este método, es un procedimiento efectivo, en especial con *H. contortus*, pues hay una fuerte relación entre el número total de parásitos y la cantidad de huevos expulsados en las heces. Asimismo, la hembra de este parásito es muy prolífica, por lo que altos conteos de huevos (vistos en hemoncosis agudas), pueden ayudar a distinguir esta enfermedad de otras infecciones por nematodos. Esta técnica, además de todo, es de bajo costo y es fácil de realizar. No obstante, siempre debe relacionarse con otros aspectos como los signos clínicos, la epidemiología, y tomar en cuenta sus limitaciones (no puede contabilizar estadios inmaduros y está condicionada a la densidad de las heces) (21)

Otra técnica muy común, sobre todo en zonas tropicales y subtropicales, es el método FAMACHA, el cual consiste en la evaluación visual de la mucosa conjuntival para detectar anemia y facilitar la decisión de aplicar o no, un tratamiento antihelmíntico. Es un gráfico que utiliza una escala del 1 al 5, donde los primeros dos números corresponden a un color

rojo-rosado de la mucosa (normal), mientras que el número 3 se considera como rosa claro (dudoso) y los últimos dos dígitos se toman como pálidos (anémicos) (25) (Figura 7). A pesar de ser una alternativa confiable, el sistema FAMACHA no es específico y presenta variaciones de acuerdo con la raza, la edad de los animales y la percepción de los evaluadores (25).



Figura 7. Gráfico FAMACHA para la detección de anemia de acuerdo con la coloración de la conjuntiva ocular. Este último proceso es fácil de realizar en el campo, pero no es específico, por lo que es recomendable sumar alguna otra técnica que lo complemente. Fuente: Naeem M, *et. al.*, 2021 (4).

Una herramienta que puede ayudar a dirigir el diagnóstico es la hematología, revisada a través de una biometría hemática y una bioquímica sanguínea. En dado caso de que estos estudios se realicen, los cambios importantes a considerar serían: anemia microcítica hipocrómica (causada por la constante pérdida de sangre en el abomaso), leucopenia con linfopenia y neutropenia (debido al secuestro de glóbulos blancos en el abomaso o al estímulo de la migración de los mismos por parte de sustancias segregadas por el helminto), eosinofilia (por respuesta a la parasitosis) e hipoproteinemia con hipoalbuminemia e hipoglobulinemia (debido a la inapetencia y a la pérdida de proteínas en el intestino causada por la infección) (26). Es de importancia mencionar, que esta técnica también carece de especificidad por lo que no debe ser la única técnica por considerar cuando se intenta complementar el diagnóstico.

En contraparte a lo recién expuesto, existen otros procedimientos, que no son empleados con frecuencia. Tal es el caso de los ensayos inmunológicos, como ELISA, que pueden presentar problemas con la especificidad del antígeno y que no pueden distinguir entre una infección superada y una en desarrollo (debido a que los niveles de anticuerpos pueden continuar elevados aún después de que la enfermedad haya entrado en remisión) (8)

De igual forma, las técnicas moleculares como PCR, a pesar de ser más específicas, han concebido conflictos de sensibilidad y de inhibidores de la reacción, o han resultado muy costosas, como la PCR en tiempo real, por lo que tampoco se utilizan con regularidad en el ámbito clínico (8).

Por otro lado, en dado caso de que el animal afectado fallezca, el método de diagnóstico correspondería a lo hallado en la necropsia. Las lesiones que se pueden encontrar fueron descritas cuando se desarrolló la patología de la enfermedad.

8. Tratamiento y resistencia antihelmíntica

El tratamiento contra *H. contortus* ha consistido, por décadas, en antihelmínticos como benzimidazoles, imidazotiazoles y lactonas macrocíclicas (tabla 3) (13). El criterio para elegir uno de estos, consiste, principalmente, en el costo y en el potencial del fármaco para desarrollar resistencia antihelmíntica (21). La resistencia, en este caso, se define como la habilidad de un organismo para sobrevivir a dosis de fármaco que, por lo general, mataría a individuos de la misma especie y etapa de vida (27). Desafortunadamente, la necesidad de un tratamiento frecuente ha sobreexponed a *H. contortus* a una gran cantidad de medicamentos, favoreciendo la resistencia y disminuyendo las opciones para su eliminación (1). A pesar de que puede haber variaciones importantes dependiendo de la región geográfica, la resistencia antihelmíntica de este parásito se ha convertido en un problema de difícil solución, pues hay lugares en donde ningún medicamento resulta efectivo (21)

Dosis de desparasitante para ovinos y caprinos		
Fármaco	Ovinos	Caprinos
Bencimidazoles		
Albendazol, fenbendazol	5.0mg/kg	10mg/kg
Oxfendazol	5.0mg/kg	10mg/kg
Sulfóxido de albendazol	3.7mg/kg	10mg/kg
Imidazotiazoles		
Levamisol	7.5mg/kg	12mg/kg
Clorhidrato de levamisol	7.5mg/kg	12mg/kg
Clorhidrato de L-levamisol	7.5mg/kg	12mg/kg

Lactonas macrocíclicas		
Ivermectina	0.2mg/kg	0.4mg/kg
Doramectina	0.2mg/kg	0.4mg/kg
Moxidectina	0.2mg/kg	0.4mg/kg

Tabla 3. Dosis de desparasitante para ovinos y caprinos. Información tomada de las guías para desparasitar correctamente a ovinos y caprinos, CONASA, 2021.

La combinación de antihelmínticos ha sido una alternativa, esperando que el parásito sea susceptible al menos a uno de ellos (27), no obstante, *H. contortus* ha demostrado resistencia a la mezcla de tres o más principios activos. Como ejemplo se tiene lo descubierto en Australia, en donde el parásito mostró resistencia a la combinación de varios fármacos provenientes de tres principales clases: benzimidazoles, imidazotiazoles y lactonas macrocíclicas (28).

Las vías de resistencia son variadas, dependiendo del fármaco del que se trate. Con respecto a los benzimidazoles, la resistencia reside en las mutaciones de los genes que codifican β -tubulina (27). En un parásito susceptible, los benzimidazoles se unen a la β -tubulina formando una capa en el extremo creciente de los microtúbulos, evitando la polimerización y causando, posteriormente la muerte del parásito (21,27). En las cepas de *H. Contortus* resistentes, el medicamento no puede unirse a la β -tubulina debido a las modificaciones genéticas y resulta inservible.

En el caso de los imidazotiazoles, estos actúan como agonistas nicotínicos en los receptores que le corresponden a acetilcolina (21), paralizando al nemátodo en cuestión. Dentro de este grupo de fármacos, el más común es el levamisol, muy usado en pequeños rumiantes y con mayor eficacia contra *H. contortus* que otros medicamentos del mismo grupo (21). No obstante, este fármaco mantiene una particularidad que el parásito aprovecha para generar resistencia. Esta característica consiste en la unión variable del levamisol, el cual puede fijarse a dos sitios diferentes en el mismo receptor, uno más afín que el otro. Un nemátodo resistente asociará el levamisol con el sitio de menor afinidad y lo hará con menor fuerza, reduciendo su eficacia de manera significativa (21).

La alteración en la unión entre ligando y receptor, en el caso del levamisol en *H. contortus*, también se debe a cambios genéticos en el último (27). Estos cambios pueden incluir:

reducción en la transcripción de genes que codifican subunidades de los receptores nicotínicos colinérgicos (27), genes truncados que expresan proteínas alteradas y obstaculizan la función normal de los receptores de acetilcolina(27,29), o bien, reducción en la transcripción de genes que codifican proteínas auxiliares, las cuales, participan en el ensamblaje de los receptores en cuestión (27). De esta forma, la resistencia al Levamisol siempre será sobre el receptor blanco, aunque los cambios sobre él sean variables (27)

Finalmente, abordando a las lactonas macrocíclicas, se ha demostrado en varios estudios que existe una resistencia basada en una glicoproteína P, la cual funciona como bomba de flujo, expulsando al fármaco fuera del parásito resistente. Asimismo, se han encontrado variaciones genéticas en el receptor diana del medicamento, aunque no en todos los grupos aislados del parásito. De esta forma, aunque se han encontrado vías por las cuales *H. contortus* puede desarrollar resistencia a esta familia de medicamentos, no se ha hallado un mecanismo convincente para explicar la resistencia observada en el campo (27). Se piensa que deben existir varias vías, por lo que abordar al nemátodo con ellas podría resultar inefectivo.

8.1 Alternativas para el control de *H. contortus*

En la actualidad, se busca realizar un control integral de los parásitos mediante prácticas que minimicen el riesgo de generar resistencia. Dentro de estas actividades se puede mencionar, por ejemplo, la rotación de pastos, el pastoreo mixto, la desparasitación selectiva dirigida, la utilización de hongos con actividad nematófaga, el manejo de una nutrición de calidad, entre otros (30)

Muchas de las opciones mencionadas buscan, principalmente, disminuir la ingesta de *H. contortus* al disminuir la contaminación excesiva de los pastos (21). Tal es el caso de la rotación de los pastos o el pastoreo mixto. En el primero, los animales no siempre ocupan toda el área de pastoreo, sino que, en momentos determinados, existen áreas que se mantienen libres de animales, permitiendo descansos adecuados (de acuerdo con la zona) para disminuir el nivel de polución de la pradera. En climas tropicales, por ejemplo, se han obtenido buenos resultados al establecer 4 días de pastoreo y 30 días de descanso (21). En el pastoreo mixto, por otra parte, se busca obtener un efecto “aspiradora”, dejando al ganado bovino entrar primero. Al ser menos susceptibles, los bovinos no permiten el desarrollo de todos los nemátodos y reducen la carga parasitaria de los pastos (30)

El uso de hongos nematófagos cumple con el mismo propósito al combatir los estadios libres de los parásitos en la materia fecal. Uno de estos hongos es *Duddingtonia flagrans*, el cual se adiciona en el alimento con el objetivo de que, al ser expulsado en las heces, forme una red tridimensional y destruya las larvas (31)

Otros métodos de control buscan generar animales resistentes, como sería el aplicar una nutrición de calidad o realizar una selección genética. El aplicar una nutrición de buenas cualidades ayuda a los ovinos a resistir la hemoncosis, sin mostrar signos clínicos o presentando algunos muy leves (21). Con respecto a la selección genética, se ha demostrado, específicamente con *H. contortus*, que los ovinos que soportan cargas pesadas del parásito, tienen un menor conteo de huevos en las heces y mantienen un hematocrito y un peso más elevado que otros individuos (32). Esto quiere decir, que, si se toma en cuenta el peso y el conteo fecal de huevos cuando el rebaño se enfrenta a un desafío significativo por *H. contortus*, se podría identificar a los ovinos más resistentes y resilientes (con buena capacidad de recuperación).

En ambas técnicas descritas anteriormente, se reducen los requerimientos del control antihelmíntico, lo que, a su vez ayuda a combatir la resistencia a los fármacos antiparasitarios (21). No obstante, tienen sus limitaciones; una de ellas implica el hecho de que los animales resistentes y resilientes siguen eliminando huevos y contaminando las pasturas, lo que es perjudicial para el resto de los animales, en especial para los más jóvenes. Otro factor por considerar incluye el procedimiento para la selección genética pues una de las características empleadas para la elección incluye la reducción en la eliminación de huevos en las heces, sin embargo, esto no es muy confiable pues no siempre la descarga de huevos está relacionada con la carga parasitaria del animal (30). Por último, la desventaja más significativa para la selección genética tiene que ver con el tiempo para obtener beneficios ya que es un proceso lento que puede durar varios años (33).

En cuanto a la desparasitación selectiva con el método FAMACHA; al tratar sólo a los animales que presenten mucosas pálidas entre valores de 4 a 5, y no a todo el rebaño, se merma la presión de selección y la aparición de cepas de nemátodos gastrointestinales con resistencia antihelmíntica. Este método también produce el efecto refugio, debido a que permite dejar cierta proporción de animales sin ser sometida a tratamiento. Cabe mencionar

que, el refugio se define como la proporción de la población de nemátodos que mantienen sensibilidad ante los desparasitantes (34) Con el método FAMACHA es de interés hacer el énfasis en que este es inespecífico y que sólo puede mejorar el programa de control, mas no remplazarlo, además de que es subjetivo, no sólo con respecto a la percepción del examinador sino también a la causa real de anemia, pues hay varios diagnósticos diferenciales que pueden provocarla y generar confusión (infecciones y deficiencias nutricionales) (30)

De acuerdo con lo explicado, se puede llegar a la conclusión de que, si bien existen alternativas para disminuir la resistencia con los procesos con los que ya se disponen, no existen opciones que puedan remplazar los fármacos causantes de la resistencia. Así, eliminar la infección por *H. contortus* en un rebaño ha resultado ser casi imposible (13). Es por esta razón, que se han propuesto compuestos químicos naturales y sus derivados como opciones que pueden remplazar a los fármacos sintéticos. Entre estos productos naturales con actividad antifúngica, antibacteriana, antiviral, antiparasitaria y anticancerígena, se encuentran las naftoquinonas (35)

9. Naftoquinonas

Las naftoquinonas son pigmentos naturales con tonos que van del amarillo al rojo. Son derivadas del naftaleno, un compuesto químico cuya estructura consiste en dos anillos aromáticos hexagonales fusionados. Estos colorantes, poseen dos grupos carbonilo en las posiciones 1,4, (1,4 naftoquinonas) y con menor frecuencia en 1,2 (1,2 naftoquinonas) en el anillo del naftaleno, y se distribuyen ampliamente alrededor del mundo (35,36) (Figura 8).

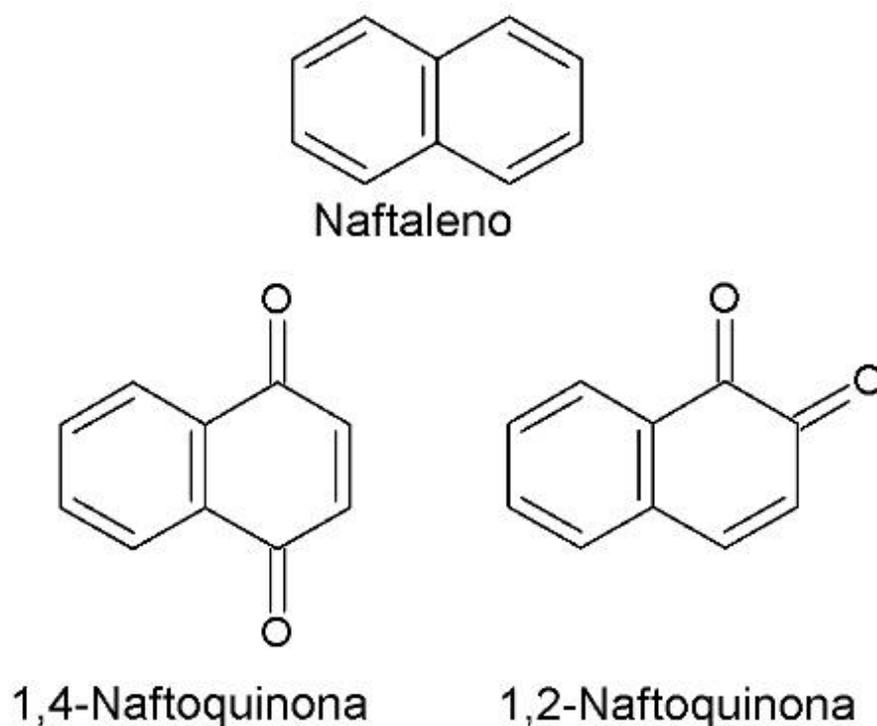


Figura 8. Estructura química del naftaleno y de 1,4 y 1,2 naftoquinona. Fuente: González C, *et. al.*, 2012 (35)

Las naftoquinonas se han aislado de plantas, hongos (naftazarina), bacterias (menaquinonas) e inclusive animales, como los erizos de mar (equinocromos) (35,36). No obstante, se encuentran principalmente en plantas Angiospermas como: *Benaceae*, *Droseraceae*, *Bignoniaceae*, *Verbenaceae*, *Plumbaginaceae*, *Juglandaceae*, *Boraginaceae*, entre otras. (36).

La naftoquinona utilizada en este trabajo es de origen vegetal por lo que se considera de interés mencionar otras del mismo origen, estas son: la lawsona, colorante naranja obtenido

de los tallos y hojas de la henna (*Lawsonia inermis*, *L. lythraceae*); la juglona, que se obtiene de las hojas y cáscara del fruto del nogal (*Juglans regia*, *L. juglandaceae*); la plumbagina, que se localiza en las especies de los géneros *Plumbago* (Plumbagináceas) *Diospyros* (Ebenáceas) y en algunos géneros de plantas carnívoras como *Drosera* y *Dionaea* (Droserdáceas); el lapachol, pigmento amarillo hallado en la corteza y madera de plantas de los géneros *Tabebuia* spp. Y *Tecoma* spp. (Bignoniáceas); la alkanina y shikonina que se encuentran en las raíces de por lo menos 150 especies que pertenecen principalmente a los géneros *Alkanna*, *Lithospermum*, *Echium*, *Onosma* y *Anchusa* de la familia Boraginaceae; la vitamina K-1 que también posee estructura de naftoquinona y se localiza en la alfalfa (*Mendicago sativa*), repollo, espinacas y coliflor; y las epoxi-naftoquinonas, aisladas de *Barleria alluaudii*. (35,36)

Más allá de sus propiedades como colorantes, todos estos compuestos han demostrado actividades biológicas de mucha importancia como antibacterianos, antifúngicos, anticancerígenos y antiparasitarios. Por ejemplo, la plumbagina tiene actividad antiinflamatoria, anticancerígena, anti-ateroesclerótica e inmunosupresora (37) (otras naftoquinonas con actividad antimutagénica incluyen la menadiona y la juglona) (37). Por otra parte, el lapachol fue la primera naftoquinona descubierta en poseer actividad contra la malaria (38), y se ha utilizado para tratar la diarrea, gonorrea e infecciones micóticas, entre otras cosas (36)

9.1 Mecanismo de acción

Las quinonas son compuestos orgánicos capaces de interactuar con objetivos biológicos, formando enlaces covalentes y actuando como agentes de transferencia de electrones en reacciones de óxido-reducción (39). Su actividad biológica está determinada, principalmente, por su aptitud para aceptar uno o dos electrones, reaccionar con el oxígeno de la respiración y forma especies reactivas de oxígeno (ERO) (36,40).

Las ERO, tales como: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (HO) y anión superóxido (O_2^-), son causantes de estrés oxidativo y dañan las proteínas, los lípidos y el ADN del microorganismo en cuestión (40,41). De hecho, durante la respuesta inmunológica contra *H. contortus*, el hospedero produce especies reactivas de oxígeno a través de macrófagos, neutrófilos y eosinófilos, como un intento para expulsar al parásito (42).

Normalmente el parásito organismo tiene un sistema antioxidante como defensa, no obstante, se ha observado que en *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) la 1,4 naftoquinona es capaz, no sólo de estimular la producción de ERO sino también de suprimir su eliminación (43). Es esta la primera razón por la cual se genera un interés en las naftoquinonas como desparasitantes (40).

Es necesario señalar que, como se mencionó anteriormente, las naftoquinonas pueden formar enlaces covalentes y no producir ERO. Este es un segundo mecanismo de acción en el que estos químicos funcionan como electrófilos (un compuesto deficiente en electrones). Estos últimos formarán enlaces covalentes con nucleófilos (compuestos ricos en electrones), en moléculas biológicas (39).

Actualmente, se ha demostrado que numerosas proteínas sufren modificaciones estructurales por reacciones electrofílicas con naftoquinonas. Estas interacciones modifican las señales celulares, debido, principalmente, a que establecen contacto con proteínas reguladoras (44). Esto mismo sucede al producirse las ERO, sin embargo, es más directo cuando la naftoquinona actúa como electrófilo.

Un ejemplo de lo precedente es la citotoxicidad que ocasionan las naftoquinonas en células cancerígenas (Figura 9). La muerte de la célula maligna puede darse por varias vías, pero todas incluyen segundos mensajeros. De esta forma, se puede inducir apoptosis al impulsar la producción de Bax (proteína apoptótica), y disminuir la generación de Bcl-2 (proteína de supervivencia o antiapoptótica) (44) o, por otro lado, se puede obtener el mismo resultado produciendo ERO, las cuales generan cascadas de señalización que culmina en la activación de caspasas efectoras y muerte apoptótica; esto último ya sea por daño a biomoléculas (se liberan al espacio extracelular y son interpretadas como señales extrínsecas de muerte) o por provocar daño por estrés oxidante, activando vías intrínsecas (45)

Asimismo, las naftoquinonas tienen la capacidad de mermar la producción de NF-KB (proteína de supervivencia y crecimiento), AKT-1 (activado por N-cadherina y con funciones en el crecimiento y metabolismo celular) (46) P13 o AKt (con papel en el metabolismo, crecimiento, proliferación y supervivencia celular) (47) y MMP9 (con participación importante en la metástasis de células tumorales) (Figura 9).

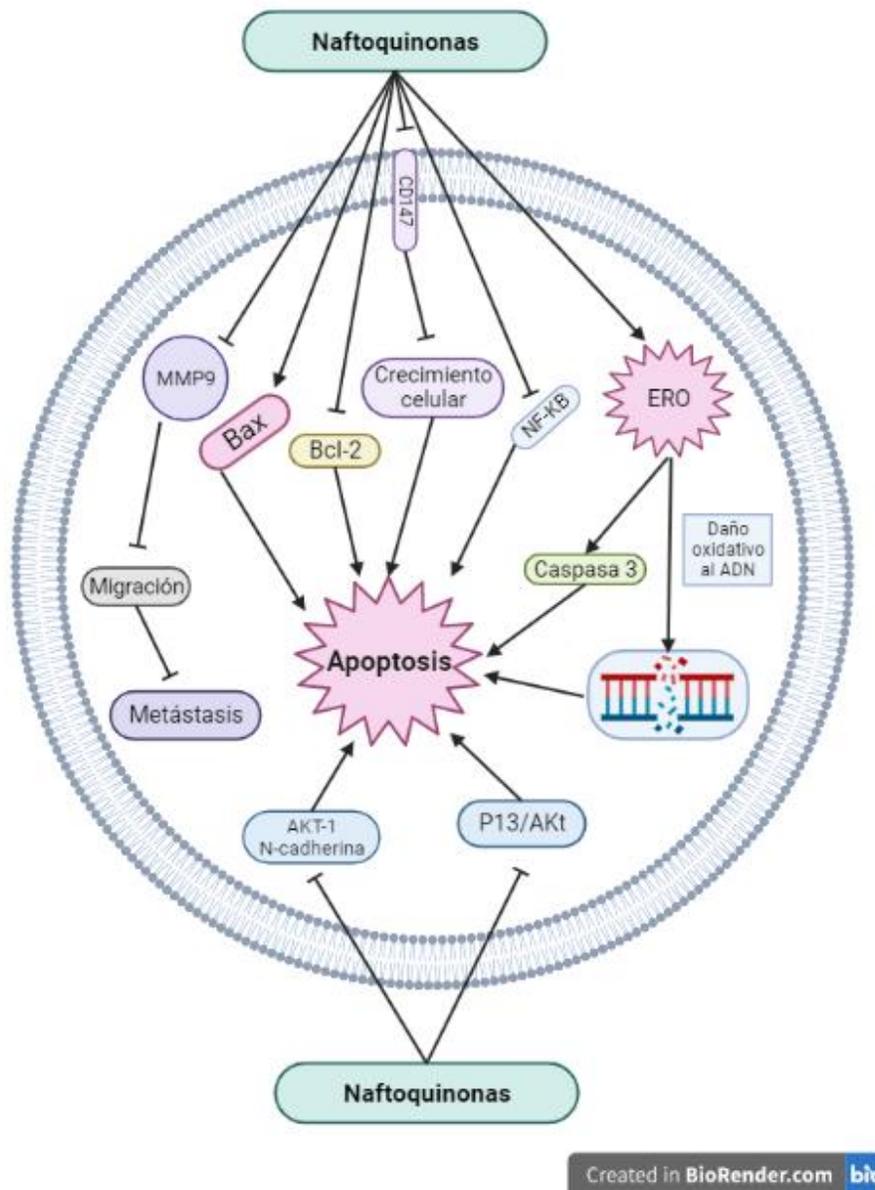


Figura 9. Representación esquemática de los principales objetivos de las naftoquinonas en la muerte celular de una célula tumoral a través de la inducción de la apoptosis.

Fuente: Figura creada en BioRender con base a la publicada por Ahmadi E. *et. al.*, 2020 (44)

En los nematodos, se ha propuesto un mecanismo de acción a partir de lo estudiado en *C. elegans* (43). Este organismo se expuso a 1,4 naftoquinona y a partir de los resultados se realizaron pruebas para determinar cómo se desencadenó la letalidad en él. Se encontró que la naftoquinona estimulaba la producción de ERO y al mismo tiempo suprimía la actividad

de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD). De igual manera, se observó que se activaban dos vías de señalización celular, una conocida como HSF-1 y otra como vía IIS, en respuesta a la naftoquinona. La primera se encarga de regular ciertas proteínas conocidas como proteínas de choque térmico, cuya función consiste en reciclar proteínas dañadas, y la segunda está involucrada con el sistema inmune y la respuesta al estrés. Estas vías activadas confirmaron que durante la exposición a la naftoquinona se genera un daño a las proteínas y, que el nematodo trata de generar una respuesta contra ella. Sin embargo, la 1,4 naftoquinona es capaz de suprimir al factor de transcripción DAF-16 (perteneciente a la vía de IIS), que regula la expresión de genes relacionados al estrés, frenando cualquier mecanismo de defensa y favoreciendo su muerte (43) (Figura 10).

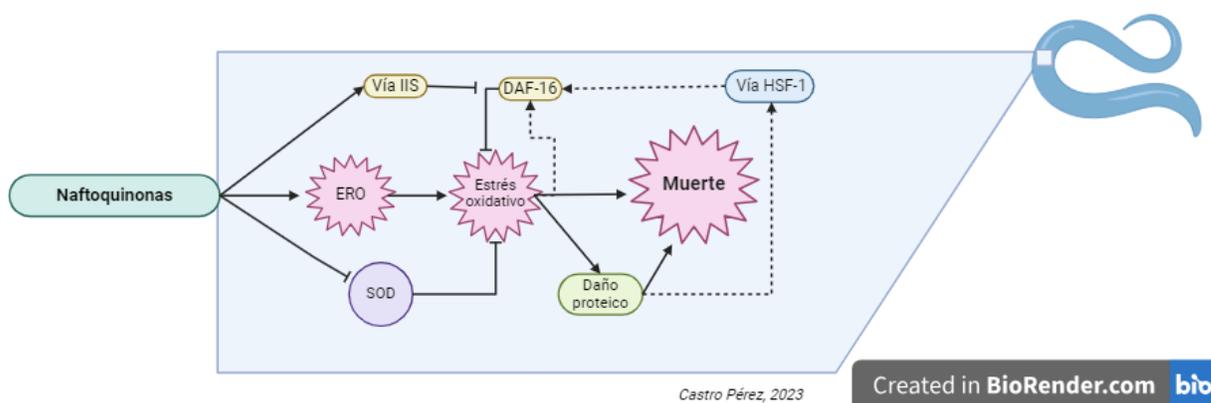


Figura 10. Representación esquemática del mecanismo nematocida de la 1,4 naftoquinona. Las líneas solidas representan mecanismos de daño al organismo, mientras que las líneas punteadas significan mecanismos de defensa por parte del nematodo. Fuente: Figura creada en BioRender con base en la publicada por Wang J. *et al.*, 2017 (43)

9.2 Actividad antiparasitaria

Como se ha revisado, las naftoquinonas tienen múltiples actividades biológicas. Una de estas acciones es la actividad antiparasitaria. En la literatura se menciona que las naftoquinonas tienen la capacidad de interferir con la cadena respiratoria mitocondrial en los parásitos susceptibles, por lo que muchas investigaciones se basaron en esto para probar los compuestos contra los organismos de interés (36)

Como ejemplo de los varios reportes que han surgido a lo largo de los años, se tiene el caso del género *Plasmodium*, un parásito protozoario causante de la enfermedad conocida como malaria o paludismo. Debido a la necesidad urgente de compuestos antimaláricos, se encontró que las naftoquinonas inhibían el crecimiento de *Plasmodium* (36). Actualmente se utiliza una naftoquinona sintetizada contra este parásito, conocida como autovacuna (36). Este compuesto también ha tenido efectos favorables contra *Babesia* spp. y *Pneumocystis carinii* (protozoario causante de neumonía particularmente grave para personas con el virus de la Inmunodeficiencia humana o VIH) (48)

En otros parásitos como *Toxoplasma gondii*, se confirmó que un compuesto a base de lapachol (una pterocarpanquinona), inhibió su crecimiento. En *Trypanozoma cruzi*, el protozoario causante del mal de Chagas, varios compuestos derivados de la lawsona resultaron más efectivos que el benznidazol (el fármaco de elección para tratar la enfermedad). De igual forma, contra el parásito del género *Leishmania*, la plumbagina y su derivado 2-metoxi-1,4-naftoquinona han demostrado actividad antiparasitaria mediante la inhibición de la enzima tripanotona reductasa (35)

En adición a lo anterior, como tratamiento profiláctico contra *Schistosoma mansoni*, el agente etiológico de la esquistosomiasis se ha propuesto romper el ciclo biológico a través de la destrucción del hospedero intermediario, el caracol *Biomphalaria glabrata* empleando las actividades molusquicidas de la lawsona y de una serie de derivados de la 1,4-naftoquinona (35). Asimismo, se ha probado la plumbagina contra el adulto del parásito *in vitro* y se ha comparado con el efecto del praziquantel; se encontró que la plumbagina tenía un impacto más rápido sobre la motilidad y supervivencia de los parásitos que el praziquantel, además de que su acción mostró menos diferencias entre machos y hembras que el fármaco (los machos eran más afectados que las hembras) (49).

Una de las últimas investigaciones de naftoquinonas como antiparasitarios incluye el efecto de las naftoquinonas contra cisticercos de *Taenia crassiceps*. En este caso, la actividad cestocida de 1,4 naftoquinona fue probada en contra de los cisticercos, resultando, de esta forma, en una disminución de la viabilidad, proliferación, tamaño e infectividad de estos. (50)

Por último, pero no menos importante se puede mencionar el informe de la actividad antihelmíntica del lapachol y de su derivado, la β -lachona contra las larvas de *Toxocara canis*. Las larvas expuestas a los compuestos mencionados no fueron viables y al ser inoculadas en ratones no causaron infección alguna (51).

Estas investigaciones inician el camino hacia la utilización de las naftoquinonas como antiparasitarios. Debido a que aún se tiene una gran diversidad de parásitos en los que podrían ser útiles y, dado que, en la actualidad, la ciencia se enfrenta a la resistencia antihelmíntica, es necesario realizar pruebas con estos compuestos naturales, ya que quizá puedan utilizarse en conjunto o remplazar a los fármacos existentes que ya no son tan efectivos.

JUSTIFICACIÓN

Dado que *H. contortus* es uno de los nemátodos que ha desarrollado mayor resistencia a los antihelmínticos, que además tiene repercusiones en la salud animal y causa importantes pérdidas económicas a nivel mundial, es necesario buscar nuevas alternativas para su tratamiento. Las naftoquinonas son productos naturales que han demostrado actividad antiparasitaria, por lo que su uso podría ser una opción viable para el tratamiento y control de este parásito.

HIPÓTESIS

La naftoquinona LLVDRMC tendrán un efecto *in vitro* larvicida sobre las L3 de *H. contortus*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto *in vitro* antihelmíntico de la naftoquinona LLVDRMC sobre la muda, motilidad y viabilidad de las L3 de *H. contortus*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar, mediante curvas concentración-respuesta, el efecto de la naftoquinona LLVDRMC sobre la motilidad, muda y mortalidad de L3 desenvainadas de *H. contortus* en cultivos *in vitro*.
2. Determinar, mediante curvas temporales, el efecto de la naftoquinona LLVDRMC sobre el motilidad, muda y mortalidad de L3 desenvainadas de *H. contortus* en cultivos *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Declaración de ética

Este proyecto no involucra el uso directo de animales por parte de los autores.

2. Obtención de L3 de *H. contortus*

Las L3 de *H. contortus* fueron donadas por el Dr. Fernando Alba Hurtado del departamento de parasitología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FES Cuautitlán), UNAM. Las larvas pertenecen a una misma cepa mantenida a lo largo de 15 años por medio de infecciones sucesivas en borregos. Cabe mencionar que, durante el desarrollo de este trabajo, se utilizaron larvas de no más de 30 días de edad.

3. Lavado de L3 de *H. contortus*

Para este proceso se realizó un gradiente de densidad. Se pesaron 20 g de azúcar y se calentaron 200 ml de agua Milli-Q en el microondas durante 60 segundos. Posteriormente, en una probeta se colocó el azúcar y 20 ml de agua Milli-Q caliente. Una vez hecho esto, se aforó hasta los 50 ml, se agitó hasta disolver el azúcar y se dejó enfriar.

De la solución azucarada resultante, se tomaron 10 ml y se colocaron en tubos cónicos de 15 ml. A continuación, se colocaron 5 ml de cultivo de larvas en cada tubo y se centrifugaron a 3,500 revoluciones por minuto (rpm) x 5 minutos a 4°C.

Después de la centrifugación, se recuperaron las larvas de la interfase que se formó a la mitad de estos. Las larvas se colocaron en tubos cónicos nuevos (previamente preparados con 10

ml de agua Milli-Q cada uno), colocando 5 ml de larvas en todos ellos. Esta nueva preparación se centrifugó a 3,500 rpm x 5 minutos. Después del centrifugado, se decantó el contenido y se volvió a aforar con 10 ml de agua Milli-Q para continuar con los lavados. Este proceso se realizó 3 veces.

Al terminar los lavados, se decantó por última vez, se tomaron las larvas y se añadieron a un tubo que contenía 10 ml de solución salina tamponada de fosfato 1X (Phosphate Buffered Saline, por sus siglas en inglés: PBS) con penicilina (200 Unidades), estreptomicina (200 µg) y anfotericina B (0.5 µg) (In Vitro). En este tubo, las larvas permanecieron por 24hrs a 4°C.

4. Proceso de obtención de L3 desenvainadas

El proceso de desenvaine se llevó a cabo con hipoclorito de sodio (Cloralex). Para iniciar, se decantó el tubo que contenía las L3 con PBS 1X y antibióticos, agregando a ese mismo tubo 10 ml de PBS 1X y 500 µl de hipoclorito sodio. Luego, este nuevo preparado, se centrifugó a 3,500 rpm x 5 minutos a 4°C. Posteriormente se realizaron 3 lavados para retirar el hipoclorito de sodio. Dichos lavados consistieron en decantar el sobrenadante, agregar 10 ml de agua Milli-Q y centrifugar a 3,500 rpm x 5 min. Antes de concluir el último lavado, se preparó un tubo con 50 ml de PBS 1X y 100 µl de penicilina (1,000 Unidades), estreptomicina (1,000 µg) y anfotericina (2.5 µg) (In Vitro).

Al finalizar los lavados las L3 se colocaron en un “mini-Baermann”, que sirvió para ayudar a las larvas a terminar el proceso de desenvaine y a migrar, separando las larvas muertas y los detritos de las vainas de las larvas viables. Este aparato se realizó con base al descrito por Huynh, T. *et. al.* 2022 (52)(52) Una vez realizado lo anterior, el aparato de “mini-Baermann” se colocó en una incubadora con 5% de CO₂ a 37°C por 24 hrs.

5. Preparación de las soluciones stock de la naftoquinona LLVDRMC

Se preparó un vial de la naftoquinona LLVDRMC en dimetilsulfóxido (DMSO), a una concentración de 10 mg/ml. La solución fue esterilizada con ayuda de un filtro de 0.2 µm (Millex-GV). Es importante señalar que el proceso de elaboración del vial se realizó en oscuridad, debido a la sensibilidad de las naftoquinonas a la luz.

A partir de la concentración de 10 mg/ml se realizó un stock de 500 µg/ml en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute, por sus siglas inglés) (In Vitro). A partir de esta concentración se generaron las soluciones a 25 (Nf25), 50(Nf50), 75(Nf75) y 100 µg/ml (Nf100) de la naftoquinona LLLVDRMC.

6. Curvas concentración-respuesta y tiempo-respuesta para evaluar el efecto de la naftoquinona LLVDRMC

El experimento se realizó tres veces por duplicado, utilizando diferentes concentraciones de naftoquinonas: 25, 50, 75 y 100 µg/ml respectivamente. Se utilizaron placas de 24 pozos estériles (Costar), y en cada pozo se colocaron 300 L3 de *H. contortus* para cada condición y la concentración correspondiente para obtener un volumen final de 2 ml. La placa de cultivo se incubó por 5 días con 5% de CO₂ a 37°C . Cabe mencionar que se agregaron tres controles: uno intacto, con sólo RPMI, el control del vehículo (DMSO) y el control positivo (ivermectina). Las lecturas se tomaron a las 0, 24, 48, 72, 96 y 120 hrs.

El resumen de la metodología realizada se muestra en la Figura 11.

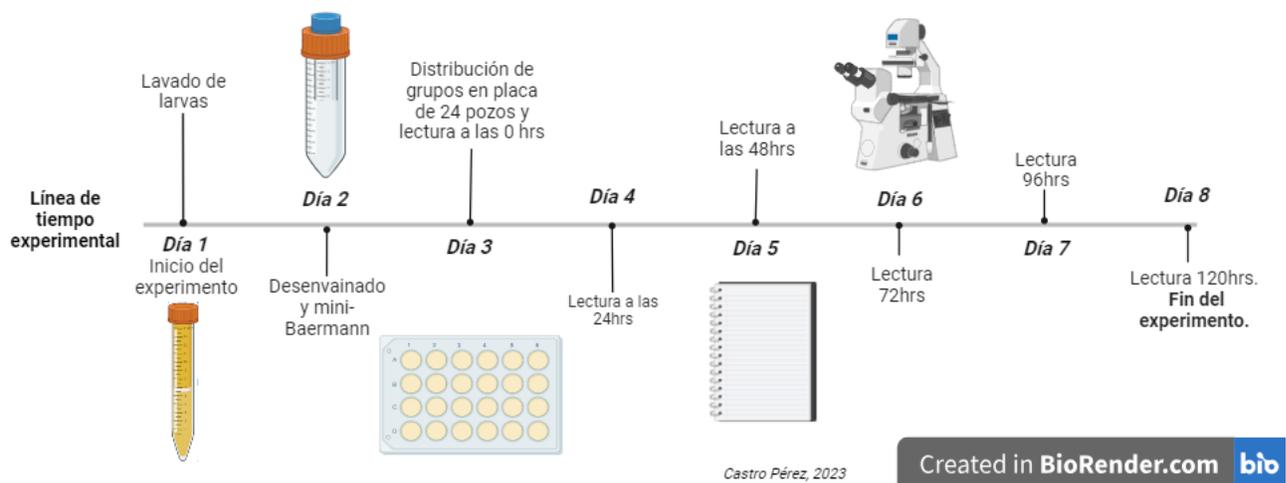


Figura 11. Línea de tiempo representativa de acuerdo con el desarrollo de la metodología. Fuente: Figura creada en BioRender.

7. Análisis estadístico

Los resultados se obtuvieron a partir de tres experimentos, cada uno con dos pozos por condición y cada pozo con 300 L3 de *H. contortus*. Empleando el programa GraphPad Prism

8.2.1 se realizaron diferentes pruebas: Para evaluar la muda se utilizó un análisis de varianza de 2 factores (2-way ANOVA) y una comparación múltiple de Bonferroni. Para la motilidad se utilizó una prueba de *t* (Unpaired *t*-test). Para la viabilidad se utilizó un análisis de varianza de un factor (One-way ANOVA) de una vía con una comparación múltiple de Bonferroni. Finalmente, para las curvas tiempo-respuesta y concentración-respuesta de viabilidad se utilizó una prueba de análisis de varianza de 2 factores (2-way ANOVA) y una comparación múltiple de Bonferroni. En todos los casos las gráficas muestran la media \pm la desviación estándar. Las diferencias fueron reconocidas como estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

1. Efecto de la naftoquinona LLVDRMC sobre la muda de las L3 desenvainadas de *H. contortus*.

El efecto de muda se calculó de acuerdo con el porcentaje obtenido de L4 en cada día de tratamiento. Para diferenciar L3 de L4 se vigiló el desarrollo de una capsula bucal (característica de la L4). No obstante, a lo largo de los días de tratamiento, ninguna larva expresó esta estructura. La figura 12 resume el porcentaje de L3 y L4 obtenidas a las 120hrs de cultivo.

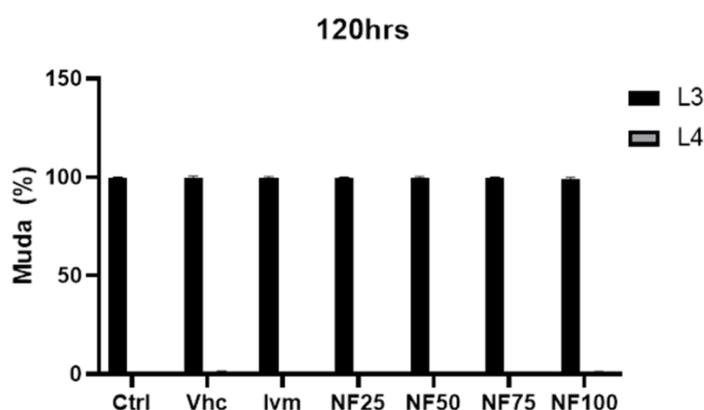


Figura 12. Porcentaje de L3 y L4 de *H. contortus* de cada condición experimental a las 120hrs de cultivo. Los datos mostrados representan la media \pm DE.

2. Efecto de la naftoquinona LLVDRMC sobre la motilidad de las L3 desenvainadas de *H. contortus*.

Para medir la motilidad se utilizó una escala de cruces, donde: tres cruces (+++) significó una motilidad completa y normal, dos cruces (++) una motilidad disminuida o lenta y una cruz (+) muy poca motilidad. Cabe mencionar que, sólo las larvas vivas se consideraron para esta característica. La figura 13 muestra la relación de la motilidad con la solución de naftoquinona más concentrada (Nf100) a lo largo del tiempo. Como se puede observar, a partir del segundo día del experimento se inicia una disminución gradual en la motilidad. En el día 3 y 4 la disminución es estadísticamente significativa con respecto al control. En el último día de tratamiento, se observó una motilidad mínima. El control positivo inhibió la motilidad desde el primer día, como se esperaba, mientras que el grupo control, en cambio, se mantuvo con una actividad normal durante los cinco días del experimento.

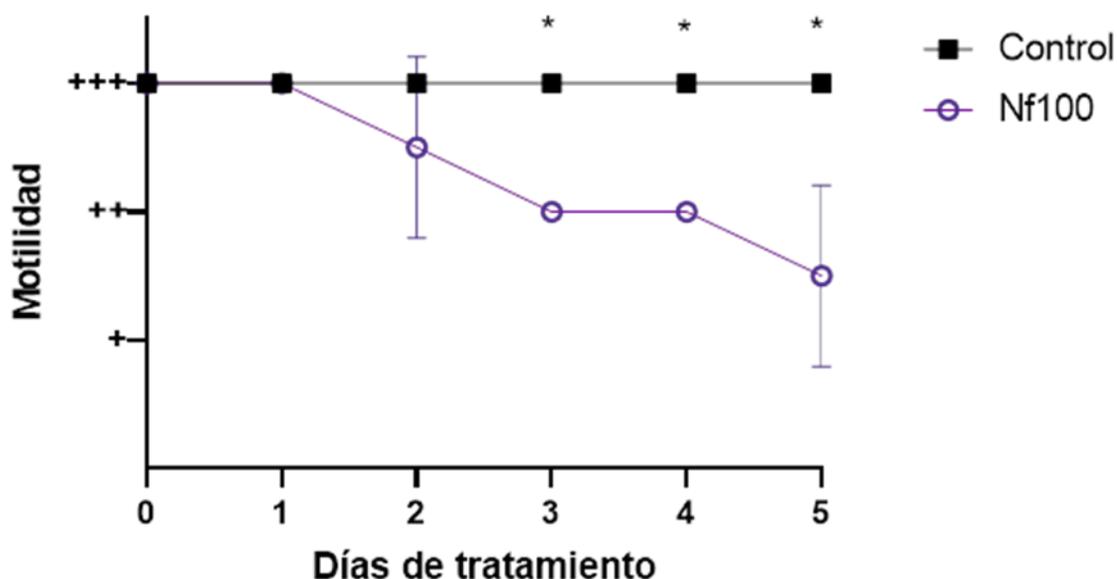


Figura 13. Gráfica tiempo-respuesta del efecto *in vitro* de la naftoquinona LLVDRMC sobre la motilidad de L3 de *H. contortus*. La naftoquinona LLVDRMC en su concentración más alta (Nf100) reduce la motilidad de las L3 de *H. contortus* a lo largo de los días de tratamiento. Los datos graficados representan la media \pm DE. Los * muestran diferencias significativas (* $P < 0.05$).

3. Efecto de la naftoquinona LLVDRMC sobre la viabilidad de las L3 desenvainadas de *H. contortus*

La viabilidad de las larvas fue evaluada de acuerdo con su motilidad, de tal manera que, la pérdida total de esta característica fue interpretada con muerte del individuo observado. De esta forma, en las figuras 13 y 14 se muestra que, a partir de las 72 hrs de tratamiento, la viabilidad de las L3 disminuyó un 31% con el tratamiento Nf75. Este efecto continuó de manera concentración y tiempo dependiente (figura 14), disminuyendo la viabilidad un 71% para las 120 hrs de cultivo. La Nf100, por otra parte, mantuvo un efecto muy similar decrementando la viabilidad un 26% a las 72 hrs y un 71% a las 120hrs. Las concentraciones de naftoquinona faltantes (Nf25 y Nf50), obtuvieron diferencias significativas (con respecto al control) hasta las 96hrs de tratamiento, reduciendo la viabilidad un 28 y 45% respectivamente.

El control positivo (tratado con ivermectina), también obtuvo diferencias significativas hasta las 96hrs de incubación, teniendo un efecto del 46% en la viabilidad de las L3. A las 120 hrs su impacto aumentó hasta un 64%. Los grupos control y control del vehículo, por otro lado, conservaron una viabilidad del 100% durante los cinco días del experimento (figura 14 y 15).

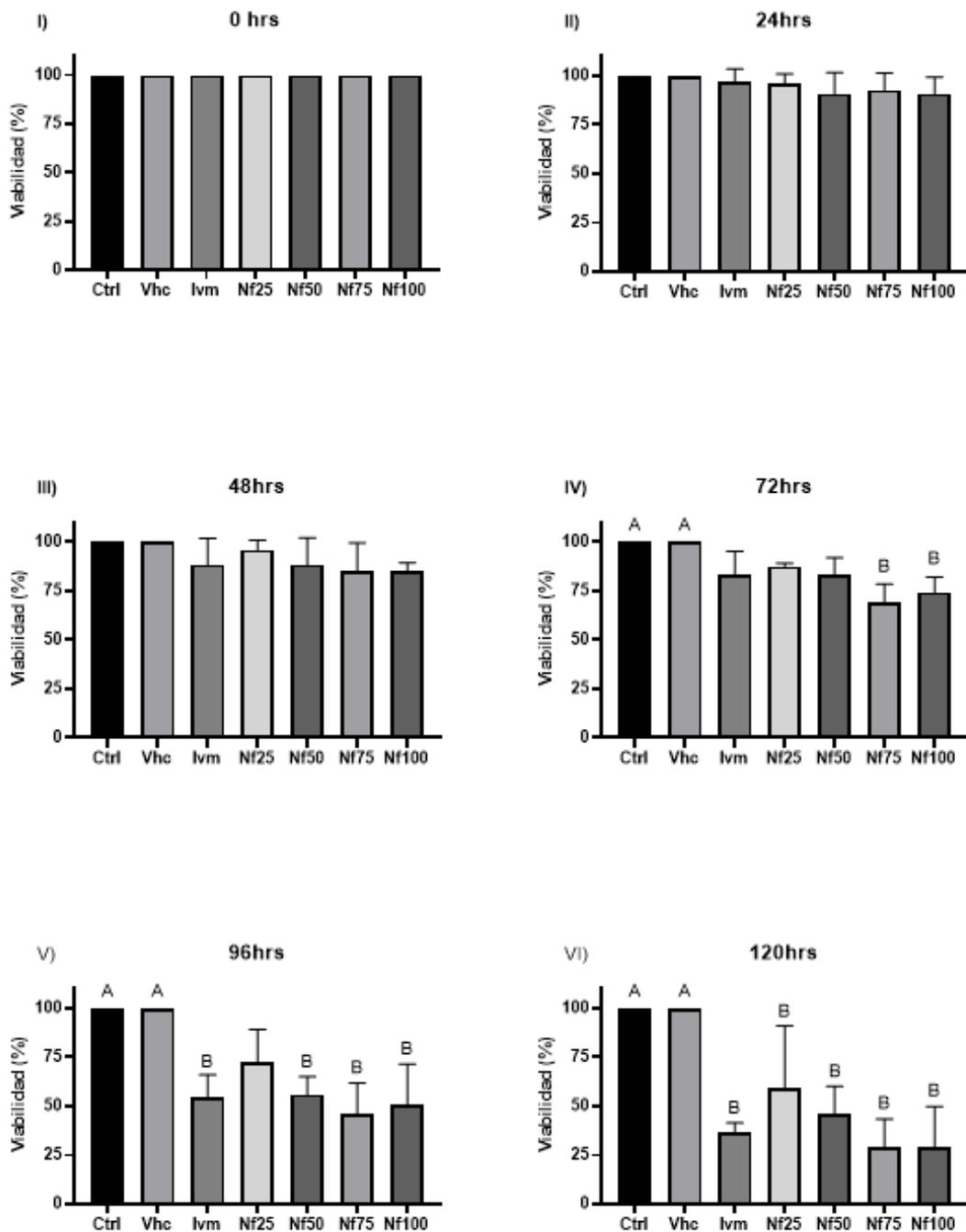


Figura 14. Viabilidad de L3 de *H. contortus* a lo largo de las hrs de tratamiento con diferentes concentraciones de naftoquinona. I)0 hrs, II)24hrs, III)48hrs, IV)72hrs, V)96hrs y VI)120hrs. Los datos mostrados representan la media de la viabilidad porcentual \pm DE. Las columnas con letras A tienen una diferencia significativa con aquellas marcadas con la letra B ($P < 0.05$). Ctrl: Control, grupo control de L3 de *H. contortus*, Vhc: Vehículo, grupo de L3

expuestas al DMSO, Ivm: Ivermectina, grupo control positivo de L3 de *H. contortus*, Nf25: naftoquinona a 25µg/ml, Nf50: naftoquinona a 50µg/ml, Nf75: naftoquinona a 75 µg/ml, Nf100: naftoquinona a 100µg/ml.

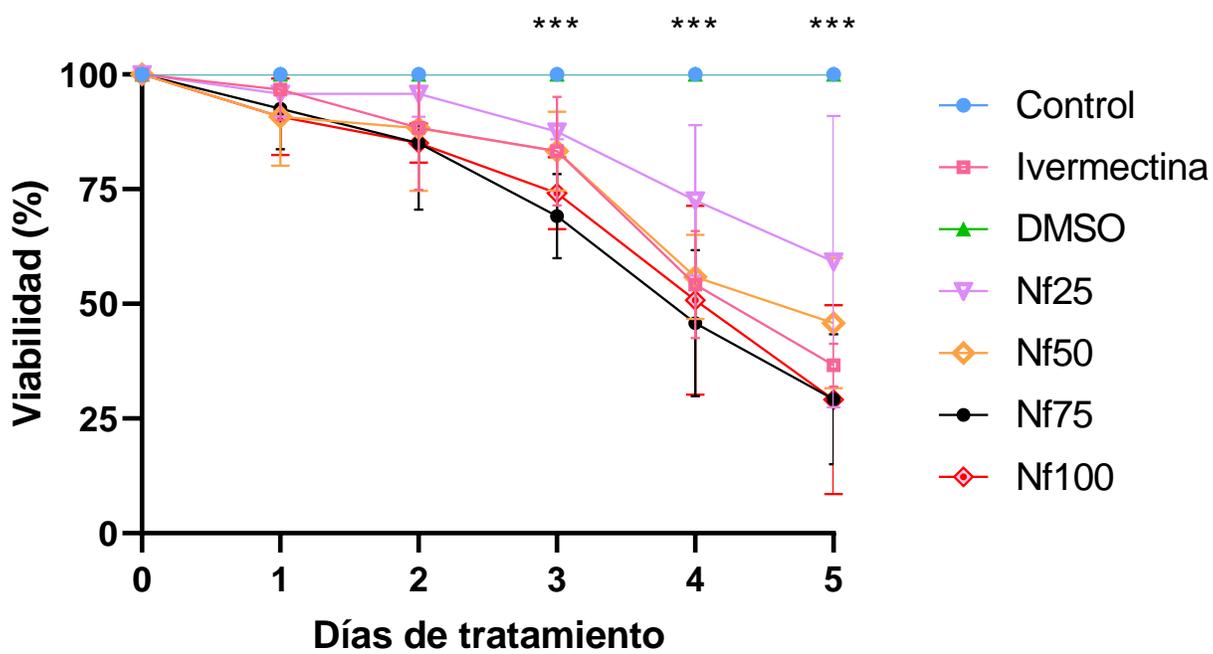


Figura 15. Gráfica concentración y tiempo-respuesta del efecto *in vitro* de la naftoquinona LLVDRMC sobre la viabilidad de L3 de *H. contortus*. Los datos graficados representan la media \pm DE. Los * muestran diferencias significativas (***) $P < 0.001$.

DISCUSIÓN

Haemonchus contortus ha demostrado su capacidad de desarrollar resistencia a las principales clases de antihelmínticos, incrementando, de esta forma, su impacto económico a nivel global y su interés en la investigación científica (27). Considerando esto, se evaluó el efecto de la naftoquinona LLVDRMC sobre L3 de *H. contortus*, buscando una alternativa a los antihelmínticos convencionales.

La muda del parásito, uno de los puntos a evaluar, no se presentó en ninguna condición durante el tiempo experimental. Esto era lo esperado para los grupos control y control del vehículo, ya que la L3 tarda un mínimo aproximado de 4-5 días en mudar a L4 (53) por lo que el tiempo de incubación (5 días) pudo no haber sido suficiente para que estos individuos

se desarrollaran. Asimismo, varios estudios han demostrado que la ivermectina tiene un efecto negativo concentración dependiente en el desarrollo larvario (54–56), por lo que la ausencia de muda en este grupo fue deseado y aceptado como control positivo. En el caso de las naftoquinonas, los resultados indican que estos compuestos no afectan la muda de forma positiva, es decir, no son capaces de acelerar el proceso. Por otra parte, la viabilidad de las larvas tratadas con naftoquinona no hace posible un análisis posterior con más días de incubación para investigar un posible efecto negativo. Esto descarta la posibilidad de poder observar un efecto en la ecdisis de L3 a L4. No obstante, el impacto de la ivermectina y de otras lactonas macrocíclicas sobre la muda de *H. contortus* comprende otros estadios larvarios, incluyendo el crecimiento del parásito desde el huevo hasta la L3 (55), de manera que, sería conveniente plantearse un ensayo con estas etapas de vida.

En cuanto a la motilidad y viabilidad, estas fueron evaluadas con curvas concentración-respuesta y tiempo-respuesta. En la curva concentración-respuesta se determinó que las dosis con mayor efecto sobre la viabilidad fueron las de Nf75 y Nf100. Estas, a pesar de ser las de mayor concentración usadas en los ensayos, contienen una muy pequeña cantidad de naftoquinona comparada con las dosis de ivermectina necesarias para causar mortalidad en las larvas: 0.2mg/ml en este estudio y hasta 5 mg/ml en otros estudios, como el realizado por Reséndiz-González *et. al.*,2022 (57). Con respecto a los tiempos de incubación, el estudio mencionado necesitó de 48hrs para que la ivermectina generara un 0% de viabilidad en las L3, mientras que en este ensayo no se obtuvo una inhibición de la viabilidad completa en los cinco días del experimento. Aunque la curva temporal marcó el mayor efecto de la naftoquinona LLVDRMC en el día 5 de tratamiento, se debe señalar que esta obtuvo un impacto significativo en la viabilidad desde el día 3. La ivermectina, en contraste, no ocasionó una disminución significativa hasta el día 4. Esto permite afirmar que, la naftoquinona es superior a la ivermectina al momento de afectar la viabilidad de las L3 de *H. contortus*.

Por otro lado, se conoce que la ivermectina, a dosis bajas, inhibe la motilidad de *H. contortus* tanto en larvas como en adultos (54,58,59). En el estudio realizado por Liu Y. *et. al.*, 2022 (59), sólo se necesitó de 100 a 400 µg/ml para conseguir entre un 50 a 100% de inmovilidad de L2 de *H. contortus*. Esto, en el mismo día de incubación. De igual forma, tal situación se

comprobó en la evaluación de la naftoquinona LLVDRMC, donde la dosis de 0.2 mg/ml de ivermectina fue suficiente para detener la motilidad de las L3 en sólo 24 hrs. No obstante, la naftoquinona no tuvo un desempeño equivalente. Según la curva temporal obtenida, el compuesto ejerce su mayor efecto a las 120 hrs de tratamiento, ya sea sobre viabilidad o motilidad de las larvas. Esto quiere decir que la naftoquinona, comparada con la ivermectina, requiere de una mayor cantidad de tiempo para disminuir la motilidad. De este modo, se puede decir que la ivermectina es más eficiente para impactar en esta característica.

Si bien es cierto que la naftoquinona se muestra en este ensayo como un potencial antihelmíntico, también es verdad que requiere de mayores pruebas en nematodos. La mayoría de los estudios disponibles para este tipo de compuestos son aquellos realizados en protozoarios como *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* spp, por lo que la información disponible para realizar comparaciones objetivas es limitada (60).

Existen estudios que evalúan la motilidad y viabilidad de los parásitos expuestos a naftoquinona, como por ejemplo el realizado contra *Schistosoma mansoni*, en donde se evaluó el efecto de la plumbagina (49). En este experimento, la concentración de 100 µg/ml de naftoquinona inmovilizó a los parásitos 1 hora después de haberlos incubado y disminuyó su viabilidad al 0% a las 24 hrs (49). Estos resultados son interesantes con respecto a lo obtenido con la naftoquinona LLVDRMC, cuyo efecto sobre las L3 de *H. contortus* fue menor, sin embargo, no se puede comparar más allá de este punto debido a la diferencia taxonómica entre parásitos.

De los pocos estudios que existen sobre nematodos, es importante mencionar el realizado por Mata-Santos *et. al.*, 2015 (51). En este análisis se probó la naftoquinona lapachol y su derivado (β -lapachona) en larvas de *Toxocara canis* incubadas durante 48 hrs. Los resultados mostraron que la β -lapachona obtuvo el mayor efecto larvicida (100%) a una dosis de 0.25 mg/ml, seguida del lapachol con 0.5 mg/ml. Estas concentraciones también inhibieron la motilidad de forma completa en el mismo tiempo establecido. En contraste a estos resultados, la naftoquinona LLVDRMC, requirió de una menor concentración para generar un efecto significativo sobre la viabilidad a las 72 hrs, aunque este no fue del 100%. Además de esto, se debe recordar que la naftoquinona demostró ser concentración dependiente, por lo que al

aumentar las dosis es posible que se consigan resultados similares al del estudio descrito. En este sentido, la naftoquinona podría mantener un efecto similar con el lapachol y su derivado.

Por último, el estudio realizado sobre *Caenorhabditis elegans* en 2017 (43), mostró que ciertas etapas de vida del nematodo eran más susceptibles a la naftoquinona. La L1 de *C. elegans* tuvo un 100% de mortalidad a las 48hrs de incubación a una dosis de 50 µg/mL, mientras que la L2 y L3 alcanzaron un aproximado del 50%. Esto confirma la necesidad de probar la naftoquinona LLVDRMC sobre otras etapas de vida de *H. Contortus* a las mismas dosis utilizadas en este ensayo. De igual modo, se requieren probar otras naftoquinonas sobre este mismo parásito, con el objetivo de encontrar el compuesto más efectivo contra él.

Es de interés señalar, que las naftoquinonas son aisladas de diferentes partes de diversas plantas (raíz, corteza de raíz, rizoma, flores, tallos y hojas) (44), por lo que una sola especie vegetal puede contener más de una naftoquinona. Esto es de importancia debido a que se podrían conseguir sinergismos o antagonismos entre estos compuestos que puedan mejorar o disminuir el efecto parasiticida de las mismas.

CONCLUSIONES

- 1) La naftoquinona LLVDRMC no tiene efecto sobre la muda de la L3 de *H. contortus*.
- 2) La naftoquinona LLVDRMC tiene un efecto larvicida concentración dependiente sobre las L3 de *H. contortus*.
- 3) La naftoquinona LLVDRMC a una concentración de 100 µg/ml disminuye la motilidad de las L3 de *H. contortus* de forma tiempo dependiente.

REFERENCIAS

1. Besier RB, Kahn LP, Sargison ND, Van Wyk JA. The Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of *Haemonchus contortus* Infection in Small Ruminants. *Adv Parasitol.* 2016; 93:95–143.
2. Taylor MA (Mike A), Coop RL, Wall R (Richard L). *Veterinary parasitology.* 4th ed. United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd; 2016. 1–1005 p.
3. Munguía-Xóchihua J., Navarro-Grave R., Hernández-Chávez J., Molina Barrios R., Cedillo-Cobián J., Granados-Reyna J. Parásitos gastroentéricos, población *Haemonchus contortus* en caprinos en clima semiárido de Bacum, Sonora, México. *Abanico Veterinario* [Internet]. el 1 de septiembre de 2018;8(3):42–50. Disponible en: <https://abanicoacademico.mx/revistasabanico/index.php/abanico-veterinario/article/view/170/187>
4. Naem M, Iqbal Z, Roohi N. Ovine haemonchosis: a review. *Trop Anim Health Prod* [Internet]. 2021 [citado el 25 de septiembre de 2022];53(19):1–11. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02439-8>
5. Quiroz-Romero H., Figueroa-Castillo J. A., Ibarra-Velarde F., López-Arellano M. A. *Epidemiología de Enfermedades Parasitarias en Animales Domésticos* [Internet]. Ciudad de México: UNAM; 2011 [citado el 5 de octubre de 2022]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/268445402>
6. Palevich N, Maclean P, Baten A, Scott R, Leathwick DM. The complete mitochondrial genome of the New Zealand parasitic roundworm *Haemonchus contortus* (Trichostrongyloidea: Haemonchidae) field strain NZ_Hco_NP. *Mitochondrial DNA Part B* [Internet]. el 3 de julio de 2019 [citado el 25 de septiembre de 2022];4(2):2208–10. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23802359.2019.1624634>
7. Schoch CL, Ciuffo S, Domrachev M, Hotton CL, Kannan S, Khovanskaya R, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database* [Internet]. el 1 de enero de 2020 [citado el 25 de enero de 2023];2020. Disponible en: <https://academic.oup.com/database/article/doi/10.1093/database/baaa062/5881509>
8. Zarlenga DS, Hoberg EP, Tuo W. The Identification of *Haemonchus* Species and Diagnosis of Haemonchosis. *Adv Parasitol.* el 1 de enero de 2016; 93:145–80.
9. Niciura SCM, Minho AP, McIntyre J, Benavides MV, Okino CH, Esteves SN, et al. In vitro culture of parasitic stages of *Haemonchus contortus*. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology* [Internet]. 2023 [citado el 19 de enero de 2024];32(1). Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612023000100302&tlng=en

10. Gutiérrez-Amézquita RA, Morales-Montor J, Muñoz-Guzmán MA, Nava-Castro KE, Ramírez-Álvarez H, Cuenca-Verde C, et al. Progesterone inhibits the in vitro L3/L4 molting process in *Haemonchus contortus*. 2017 [citado el 3 de enero de 2024]; Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.10.011>
11. Martínez-Ortiz-de-Montellano C, Felipe de Jesús Torres-Acosta J, Alfredo Sandoval-Castro C, Fourquaux I, Hoste H. Scanning electron microscopy of different vulval structures in a Mexican *Haemonchus contortus* isolate. 2021 [citado el 28 de septiembre de 2022]; Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100640>
12. Kuchai JA, Ahmad F, Chishti MZ, Tak H, Ahmad J, Ahmad S, et al. A Study on Morphology and Morphometry of *Haemonchus contortus*. *Pakistati J Zool.* 2012;44(6):1737–41.
13. Lucius R, Loos-Frank B, Lane RP, Poulin R, Roberts CW, Grensis RK. *The Biology of Parasites*. Weinheim: Wiley-VCH; 2017.
14. Palermo Mendes J, Tsuzuki TT, Barbosa Ferreira M, Rodrigues Garcia W, Valentim JK, Rolim Pietramale RT. *Haemonchus contortus* e Medidas Estratégicas de Controle para Ovinos. *Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde* [Internet]. el 26 de agosto de 2020;24(2):105–10. Disponible en: <https://seer.pgsskroton.com/index.php/ensaioeciencia/article/view/8664>
15. Aguilar-Caballero A, Cámara Ramón, Torres Felipe J., Sandoval Carlos. El control de nematodos gastrointestinales en caprinos: ¿dónde estamos? *Bioagrocencias* [Internet]. 2011;4(2):10–6. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/267098507>
16. Gatongi PM, Prichard RK, Ranjan S, Gathuma JM, Munyua WK, Cheruiyot H, et al. Hypobiosis of *Haemonchus contortus* in natural infections of sheep and goats in a semi-arid area of Kenya. *Vet Parasitol.* 1998; 77:49–61.
17. González-Garduño R, Arece-García J, Torres-Hernández G. Review Physiological, immunological and genetic factors in the resistance and susceptibility to gastrointestinal nematodes of sheep in the peripartum period: A review. *Helminthologia.* 2021; 58:134–51.
18. Rahman WA, Collins GH. An association of faecal egg counts and prolactin concentrations in sera of periparturient Angora goats. *Vet Parasitol.* 1992; 43:85–91.
19. Fernando AH, Antonio Muñoz-Guzmán M. Immune Responses Associated with Resistance to Haemonchosis in Sheep. *Biomed Res Int* [Internet]. 2013; 2013:11. Disponible en: <http://dx>.
20. Cardona A J, Álvarez P J, Pérez O J. Muerte súbita por alotrofia y hemoncosis en una cabra (*Capra aegagrus hircus*) del departamento de córdoba, Colombia. *Revista*

- Colombiana de Ciencia Animal - RECIA [Internet]. el 1 de julio de 2017;9(2):222–6. Disponible en: <https://revistas.unisucre.edu.co/index.php/recia/article/view/561>
21. Besier RB, Kahn LP, Sargison ND, Van Wyk JA. Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. *Adv Parasitol.* 2016; 93:181–238.
 22. Ahmad RZ, Tiffarent R. Pathological Aspects of Haemonchosis in Goats and Sheeps. *Indonesian Bulletin of Animal and Veterinary Sciences.* el 3 de julio de 2020;30(2).
 23. Hunter AR, Mackenzie G. The pathogenesis of a single challenge dose of *Haemonchus contortus* in lambs under six months of age. *J Helminthol* [Internet]. 1982 [citado el 16 de octubre de 2022]; 56:135–44. Disponible en: <https://doi.org/10.1017/S0022149X00034362>
 24. Thomas R.J, Ali D. A. The effect of *Haemonchus contortus* infection on the pregnant and lactating ewe. *Int J Parasitol.* 1983; 4:391–400.
 25. Ferreira JB, Sotomaior CS, Bezerra A, da Silva W, Leite J, de Sousa J, et al. Sensitivity and specificity of the FAMACHA© system in tropical hair sheep. *Trop Anim Health Prod* [Internet]. 2019 [citado el 22 de octubre de 2022];51(6):1767–71. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s11250-019-01861-x>
 26. Alam RTM, Hassanen EAA, El-Mandrawy SAM. *Haemonchus Contortus* infection in Sheep and Goats: alterations in haematological, biochemical, immunological, trace element and oxidative stress markers. *J Appl Anim Res* [Internet]. el 1 de enero de 2020 [citado el 16 de octubre de 2022];48(1):357–64. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09712119.2020.1802281>
 27. Kotze AC, Prichard RK. Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*. History, Mechanisms and Diagnosis. *Adv Parasitol.* 2016; 93:397–428.
 28. Lyndal-Murphy M, Ehrlich W, Mayer D. Anthelmintic resistance in ovine gastrointestinal nematodes in inland southern Queensland. *Aust Vet J* [Internet]. 2014;92(11):415–20. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/avj.12250>
 29. Prichard R, Lespine A. Genetics and mechanisms of drug resistance in nematodes. *Parasitic nematodes: molecular biology, biochemistry and immunology.* 2013;156–83.
 30. Cuéllar Ordaz Alfredo. Control no farmacológico de parásitos en ovinos. *Nemátodos gastroentéricos. Sitio Argentino de Producción animal.* 2007;1–12.
 31. Ottesen EA, Hightower AW, Lammie PJ, Eberhard ML, Steel C. Worm Control and Anthelmintic Resistance: Adventures with a Model. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992; 13:291–6.

32. Kelly GA, Kahn LP, Walkden-Brown SW. Measurement of phenotypic resilience to gastro-intestinal nematodes in Merino sheep and association with resistance and production variables. *Vet Parasitol* [Internet]. 2013 [citado el 27 de noviembre de 2022]; 193:111–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.018>
33. Bisset SA, Vlassoff A, Morris CA, Southey BR, Baker RL, Parker AGH. Heritability of and genetic correlations among faecal egg counts and productivity traits in Romney sheep. 1992 [citado el 27 de noviembre de 2022]; Disponible en: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tnza20>
34. Vargas Rodríguez Claudio Fabián. FAMACHA. *Agronomía mesoamericana*. 2006;17(1):79–88.
35. Cantú González RN, Palomo Ligas L, Nery Flores SD, López López LI, Barajas Bermúdez L. Naftoquinonas: de simples pigmentos a moléculas terapéuticas. *Biológicas*. 2012;14(2):48–56.
36. López L. LL., Leyva E., García de la Cruz R. Las naftoquinonas: más que pigmentos naturales. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* [Internet]. 2011 [citado el 30 de noviembre de 2022];42(1):6–17. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57918590002>
37. Kumar S, Gautam S, Sharma A. Antimutagenic and antioxidant properties of plumbagin and other naphthoquinones. *Mutat Res* [Internet]. 2013 [citado el 30 de noviembre de 2022]; 755:30–41. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.05.007>
38. Sharma A, Santos IO, Gaur P, Ferreira VF, Garcia C, da Rocha D. Addition of thiols to o-quinone methide: New 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl[1,4]naphthoquinones and their activity against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* (3D7). *Eur J Med Chem* [Internet]. 2013 [citado el 4 de diciembre de 2022]; 59:48–53. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523412006563>
39. Kumagai Y, Shinkai Y, Miura T, Cho AK. The Chemical Biology of Naphthoquinones and Its Environmental Implications. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/101146/annurev-pharmtox-010611-134517> [Internet]. 2012 [citado el 30 de noviembre de 2022]; 52:221–47. Disponible en: <https://www-annualreviews-org.pbidi.unam.mx:2443/doi/abs/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134517>
40. Escuadra Gallegos Magdalena. Síntesis de un ácido derivado de la 2-metil 1,4 naftoquinona con posible actividad leishmanicida. [Ciudad de México]: Universidad Nacional Autónoma de México; 2005.
41. Kotze AC. Catalase induction protects *Haemonchus contortus* against hydrogen peroxide in vitro. *Int J Parasitol* [Internet]. 2003 [citado el 12 de marzo de 2023]; 33:393–400. Disponible en: www.parasitology-online.com

42. Pivoto FL, Torbitz VD, Aires AR, da Rocha JFX, Severo MM, Grando TH, et al. Oxidative stress by *Haemonchus contortus* in lambs: Influence of treatment with zinc edetate. *Res Vet Sci* [Internet]. 2015 [citado el 9 de marzo de 2023]; 102:22–4. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034528815300096>
43. Wang J, Zeng G, Huang X, Wang Z, Tan N. 1,4-Naphthoquinone Triggers Nematode Lethality by Inducing Oxidative Stress and Activating Insulin/IGF Signaling Pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Molecules* [Internet]. 2017 [citado el 25 de enero de 2024];22(5):798. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1420-3049/22/5/798>
44. Ahmadi ES, Tajbakhsh A, Iranshahy M, Asili J, Kretschmer N, Shakeri A, et al. Naphthoquinone Derivatives Isolated from Plants: Recent Advances in Biological Activity. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2020;20(19):2019–35.
45. Hernández Espinosa DR, Barrera Morín V, Briz Tena O, González Herrera EA, Laguna Maldonado KD, Jardinez Díaz AS, et al. El papel de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en algunas enfermedades neurodegenerativas. *Revista de la Facultad de Medicina* [Internet]. 2019 [citado el 11 de diciembre de 2022];62(3):6–19. Disponible en: http://revistafacmed.com/index.php?option=com_phocadownload&view=file&id=1152:el-papel-de-las-especies-reactivas-de-oxigeno-y-de-nitrogeno&Itemid=1
46. Zhang J, Shemezis JR, McQuinn ER, Wang J, Sverdlov M, Chenn A. AKT activation by N-cadherin regulates beta-catenin signaling and neuronal differentiation during cortical development. *Neural Dev* [Internet]. 2013 [citado el 11 de diciembre de 2022];8(1). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23618343/>
47. Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(9).
48. Baggish AL, Hill DR. Antiparasitic agent atovaquone. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2002 [citado el 11 de diciembre de 2022];46(5):1163–73. Disponible en: <https://journals.asm.org/journal/aac>
49. Lorsuwannarat N, Saowakon N, Ramasoota P, Wanichanon C, Sobhon P. The anthelmintic effect of plumbagin on *Schistosoma mansoni*. *Exp Parasitol* [Internet]. 2013 [citado el 4 de agosto de 2023];133(1):18–27. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489412003141>
50. Aranda-López Y, López-López L, Castro KEN, Ponce-Regalado MD, Becerril-Villanueva LE, Girón-Pérez MI, et al. Cysticidal effect of a pure naphthoquinone on *Taenia crassiceps* cysticerci. *Parasitol Res*. 2021;120(11):3783–94.
51. Mata-Santos T, Pinto Nitza F, Mata-Santos H, De Moura K, Carneiro P, Carvalho T, et al. Anthelmintic activity of Lapachol, β -Lapachone and its derivatives against

- Toxocara canis larvae. Rev Inst Med Trop Sao Paulo [Internet]. 2015 [citado el 11 de diciembre de 2022];57(3):197–204. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652015000300197&lng=en&tlng=en
52. Huynh T, McKean EL, Hawdon JM. Mini-Baermann Funnel, a simple device for cleaning nematode infective larvae. Journal of Parasitology [Internet]. 2022;108(4):403–7. Disponible en: <https://bioone.org/journals/journal-of-parasitology/volume-108/issue-4/22-47/Mini-Baermann-Funnel-a-Simple-Device-for-Cleaning-Nematode-Infective/10.1645/22-47.full>
 53. Hernández Barral A. Estudio de la respuesta inmune frente a *Haemonchus contortus* en dos razas ovinas canarias. Universidad de las Palmas de Gran Canaria; 2011.
 54. Gill JH, Redwin JM, Van Wyks JA, Lacey E. Avermectin Inhibition of Larval Development in *Haemonchus contortus*. Effects of Ivermectin Resistance. International Journal for Parasitology. 1995;25(4):463–70.
 55. Demeler J, Gill JH, von Samson-Himmelstjerna G, Sangster NC. The in vitro assay profile of macrocyclic lactone resistance in three species of sheep trichostrongyloids. Int J Parasitol Drugs Drug Resist [Internet]. 2013 [citado el 22 de enero de 2024];3:109–18. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211320713000092>
 56. Kotze AC, Ruffell AP, Knox MR, Kelly GA. Relative potency of macrocyclic lactones in in vitro assays with larvae of susceptible and drug-resistant Australian isolates of *Haemonchus contortus* and *H. placei*. Vet Parasitol [Internet]. 2014 [citado el 21 de enero de 2024]; 203:294–302. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.04.0050304-4017/>
 57. Reséndiz-González G, Higuera-Piedrahita RI, Lara-Bueno A, González-Gardúño R, Cortes-Morales JA, González-Cortazar M, et al. In Vitro Anthelmintic Activity of a Hydroalcoholic Extract from Guazuma ulmifolia Leaves against *Haemonchus contortus*. Pathogens [Internet]. 2022;11(10):1160. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-0817/11/10/1160>
 58. Demeler J, Von Samson Himmelstjerna G, Sangster N. Measuring the effect of avermectins and milbemyzins on somatic muscle contraction of adult *Haemonchus contortus* and on motility of *Ostertagia circumcincta* in vitro. Parasitology [Internet]. 2014 [citado el 24 de enero de 2024];141(7):948–56. Disponible en: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182013002291/type/journal_article
 59. Liu Y, Luo X, Li J, Wang P, Teng B, Wang R, et al. Using feeding and motility patterns for ivermectin resistance detecting in *Haemonchus contortus* larvae. Exp Parasitol [Internet]. 2022 [citado el 24 de enero de 2024]; 238:108230. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489422000248>

60. Aranda López Yuli. Evaluación in vitro del efecto antihelmíntico de la naftoquinona LLJMY3 sobre cisticercos de *Taenia crassiceps*. [Ciudad de México]: Universidad Nacional Autónoma de México; 2016.