


Evaluación antihelmíntica *in vitro* de curcumina contra huevos y larvas de aislados de *Haemonchus contortus* con distinta susceptibilidad a ivermectina



Lisandro Alberto Encalada-Mena ^a

Raquel López-Arellano ^b

María Eugenia López-Arellano ^c

María Gabriela Mancilla-Montelongo ^d

Carlos Alfredo Sandoval-Castro ^{e*}

Agustín Olmedo-Juárez ^c

Juan Felipe de Jesús Torres-Acosta ^e

^a Universidad Autónoma de Campeche, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Campeche, México.

^b Universidad Nacional Autónoma de México. FES-Cuautitlán, Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico, Estado de México, México.

^c Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, Morelos, México.

^d CONAHCYT-Universidad Autónoma de Yucatán. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Yucatán, México.

^e Universidad Autónoma de Yucatán, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Km 15.5 Carr. Mérida-Xmatkuil, 97315, Mérida, Yucatán, México.

*Autor de correspondencia: carlos.sandoval@correo.uady.mx

Resumen:

El creciente problema de resistencia a los antihelmínticos (AHs) convencionales en poblaciones de nematodos gastrointestinales (NGI), ha motivado la búsqueda de alternativas para su control en los rebaños de ovinos y caprinos, como es el caso de los metabolitos secundarios de plantas. En el presente trabajo se evaluó la actividad AH *in vitro* de curcumina (CUR) contra tres aislados del nematodo de rumiantes *Haemonchus contortus* con diferente susceptibilidad a los AHs convencionales. Se utilizaron las pruebas *in vitro* de inhibición de la eclosión de huevos (IEH), inhibición de la migración larvaria (IML), inhibición del desvaine larvario (IDL) y mortalidad a las 72 h de L₃ sin vaina. Las pruebas se realizaron usando un intervalo de concentraciones de 0 - 8.5 µg CUR/ml. Solamente la prueba de IDL fue realizada con un intervalo de concentración de 0 - 17.3 µg CUR/ml. Se obtuvieron las curvas de concentración-respuesta en una regresión log-logística y se realizó un diseño completamente al azar mediante un ANOVA. La CUR no presentó actividad AH en las pruebas de IEH, IML y mortalidad, pero sí demostró efecto AH significativo en la prueba de IDL. Este efecto fue más potente contra el aislado FMVZ-UADY (CE₅₀= 1.9 µg/ml, IC₉₅% 1.58-2.31), seguido por el aislado Paraíso (CE₅₀= 3.2 µg/ml, IC₉₅% 2.69-3.81) y CENID-SAI, INIFAP (CE₅₀= 7.0 µg/ml; IC₉₅% 6.58-7.43). Se concluye que la CUR tiene efecto AH contra el desvaine de las L₃ de *H. contortus* pero no afecta la eclosión de huevos, la migración de L₃ o la mortalidad de L₃ sin vaina a las dosis evaluadas.

Palabras clave: Polifenol, Antihelmíntico, Desvaine larvario, Estabilizadores poliméricos.

Recibido: 26/04/2023

Aceptado: 03/07/2024

Introducción

Los nematodos gastrointestinales (NGI) representan uno de los principales problemas de salud de rumiantes en pastoreo^(1,2). Los pequeños rumiantes que padecen infecciones altas por NGI presentan alteraciones digestivas que ocasionan retraso del crecimiento o disminuyen los indicadores productivos. También pueden causar anemia, edema y, en casos muy severos, la muerte del animal^(3,4). *Haemonchus contortus* es uno de los NGI de mayor relevancia debido a su patogenicidad y su amplia distribución en regiones tropicales y subtropicales del mundo⁽⁵⁾. El control de estos parásitos se basa en el uso de desparasitantes comerciales que, con el tiempo han favorecido la selección de poblaciones con resistencia a los antihelmínticos (RA)⁽⁶⁾. La creciente problemática de poblaciones de NGI con RA ha

motivado la búsqueda de medidas alternativas de control⁽⁷⁾. Entre éstas, se encuentra el uso de metabolitos secundarios de plantas, en particular los compuestos polifenólicos, que han demostrado su efecto antihelmíntico (AH) contra diferentes fases de vida del *H. contortus*^(8,9). La planta *Curcuma longa* L. pertenece a la familia Zingiberácea y es nativa del continente asiático. El principal polifenol encontrado en los extractos obtenidos de *C. longa* es la curcumina (CUR) (60-75 %), junto con la desmetoxicurcumina y bisdesmetoxicurcumina en menor proporción^(10,11). A la CUR se le han confirmado diversas actividades farmacológicas como anti-oxidante, anti-inflamatorio, anti-cancerígeno, anti-viral, anti-bacterial y anti-parasitario⁽¹²⁻¹⁸⁾. La evaluación de la actividad antiparasitaria de CUR se ha realizado mediante extractos obtenidos con solventes de diferente polaridad a partir de distintas partes de plantas de *C. longa*. La actividad AH ha sido evaluada contra adultos, L₃ y huevos de *H. contortus* a diversas concentraciones (mg/ml)⁽¹⁹⁻²¹⁾ generalmente empleando altas dosis debido a que la CUR presenta baja solubilidad en agua, pobre absorción, rápida degradación, y por tanto, presenta una reducida biodisponibilidad⁽¹⁰⁾. Estas características han llevado a la búsqueda de procesos que permitan aumentar su solubilidad mediante la encapsulación de los metabolitos secundarios en nanopartículas lipídicas, nanoemulsiones, nanoliposomas, polímeros biodegradables, dendrímeros, hidrogeles, uso de caseína y ciclodextrinas^(22,23). Así, recientemente se ha propuesto una combinación de la CUR con estabilizadores poliméricos como la polivinilpirrolidona (PVP) en forma de dispersión sólida (CUR/PVP)^(24,25). Esta combinación mejora la solubilidad de la CUR y mantiene baja su toxicidad en células y tejidos⁽²⁶⁻²⁸⁾. Por otro lado, los pocos trabajos que han evaluado la actividad AH *in vitro* de los extractos de *C. longa* no mencionan las concentraciones del metabolito CUR en los bioensayos, y solo se supone que el efecto AH reportado se debe al contenido de CUR y otros curcuminoides⁽¹⁹⁻²¹⁾. Por lo tanto, la actividad AH de la CUR contra *H. contortus* no se ha demostrado plenamente. El objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad AH *in vitro* de la CUR sobre tres aislados de *H. contortus* con distintos estatus de RA.

Material y métodos

Consideraciones éticas experimentales

Todos los animales experimentales se manejaron siguiendo las Normas Oficiales Mexicanas para colecta de germoplasma (NOM-051-ZOO-1995 y NOM-062-ZOO-1999) (www.gob.mx/senasica). Así mismo, se siguieron los lineamientos éticos del Comité de Bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán (FMVZ-UADY) (Permiso No. CB-CCBA-D-2021-005).

Lugar del estudio

La producción de *H. contortus* en animales donadores con infecciones monoespecíficas controladas, y los bioensayos *in vitro* se realizaron en la FMVZ-UADY, Xmatkuil, Mérida, México.

Aislados de *Haemonchus contortus*

Se utilizaron tres aislados de *H. contortus* cuya caracterización de resistencia a AH se conocía antes de realizar el presente estudio:

(1) El aislado “Paraíso” proveniente de una granja ovina comercial ubicada en Umán, Yucatán, México, con antecedentes de resistencia a ivermectina (IVM; *i.e.* reducción de huevos en heces: 64 %), sulfóxido de albendazol (ABZ; reducción de huevos en heces: 0 %) y levamisol (LEV; reducción de huevos en heces: 92 %)⁽²⁹⁾.

(2) El aislado “FMVZ-UADY”, originario de una granja ubicada en Mérida, Yucatán, con antecedentes de NGI resistentes a ABZ (*i.e.* reducción de huevos en heces: 89 %) y LEV (reducción de huevos en heces: 87 %)⁽³⁰⁾, pero susceptible a IVM (*i.e.* reducción de huevos en heces 99 %)⁽²⁹⁾.

(3) El aislado CENID-SAI-INIFAP, fue proporcionado por el departamento de Helmintología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Este aislado fue caracterizado en la FMVZ-UADY con técnicas *in vitro* como susceptible a tiabendazol (TBZ) ($CE_{50}=0.050 \mu\text{g/ml}$) de acuerdo con la metodología de eclosión de huevos descrita por Von Samson-Himmelstjerna *et al*⁽³¹⁾, y de acuerdo a la técnica de migración larvaria⁽³²⁾ susceptible a IVM ($CE_{50}=1.09 \mu\text{M}$)⁽³³⁾. Así mismo en 2020, este aislado fue caracterizado como susceptible a IVM (79.22 % mortalidad a 11.42 mM) mediante la técnica de mortalidad *in vitro*⁽³⁴⁾.

Donadores y obtención de aislados monoespecíficos de *Haemonchus contortus*

Se utilizaron seis caprinos de entre 3 y 4 meses de edad de 15 kg de peso vivo (PV), criados libres de NGI desde el nacimiento. Para cada aislado, anteriormente descritos, de *H. contortus* se infectaron dos animales donadores, cada uno recibió 7,000 L₃ *per os*⁽³⁵⁾. En todo momento los animales se mantuvieron en jaulas individuales con piso elevado ubicadas dentro de corrales individuales con piso de concreto en las instalaciones de la FMVZ-UADY.

A partir de los 24 días post-infección se obtuvieron muestras de heces directamente del recto de cada animal donador usando bolsas de polietileno nuevas⁽³⁶⁾. Las muestras de heces se usaron para determinar la presencia y el número de huevos por gramo de heces (HPG) mediante la técnica de McMaster⁽³⁷⁾; esta prueba se realiza con 2 g de heces y 28 ml de solución saturada de azúcar (densidad= 1.28 y sensibilidad de 50 HPG). A continuación, se realizaron coprocultivos en frascos de plástico limpios y se incubaron a 28 °C durante 5-6 días para obtener L₃, las cuales se recuperaron de las heces mediante la técnica de Baermann⁽³⁸⁾. Finalmente fueron identificadas como *Haemonchus* utilizando claves morfológicas⁽³⁹⁾.

Obtención de huevos de *Haemonchus contortus*

La obtención de huevos se realizó de acuerdo al procedimiento de MAFF (1986)⁽³⁸⁾. Se colectaron las heces directamente del recto de los animales donadores usando bolsas de polietileno. En el laboratorio, las heces se depositaron en un colador de plástico colocado sobre un mortero de porcelana. Se añadieron 100 ml de agua por cada 10 g de heces y se procedió a macerar las heces. La suspensión de heces con agua se filtró usando una capa doble de gasa colocada en un embudo, y el líquido se recuperó en un matraz. Este líquido se tamizó a través de una malla de 25 µm con la mínima cantidad de agua sin cloro. Se recuperaron los huevos del tamiz y se colocaron en tubos de 50 ml. Los tubos (5810R, Eppendorf, Alemania) se centrifugaron a 453 g por 5 min. Después se eliminó el sobrenadante conservando el sedimento, al que se añadieron 25 ml de solución saturada de azúcar (densidad= 1.28). El sedimento se volvió a suspender con ayuda de un vórtex y los tubos fueron centrifugados nuevamente. Se recuperó la capa superficial de la solución con un asa bacteriológica, y ésta fue depositada en otro tubo de plástico con una solución de agua purificada por ósmosis inversa. Este procedimiento se realizó varias veces para tratar de recuperar la mayor cantidad de huevos posibles. Posteriormente se estimó su concentración por mililitro y se ajustó hasta lograr una suspensión de 200 huevos/ml.

Producción de L₃ de *Haemonchus contortus*

La producción de L₃ consistió en recuperar cada 24 h todas las heces que los animales donadores depositaron en la malla plástica colocada debajo de cada una de las jaulas individuales. Las heces colectadas de cada donador se pasaron a bolsas de polietileno nuevas claramente identificadas para su traslado al laboratorio. Después de la incubación, las L₃ se recuperaron con el aparato de Baermann⁽³⁸⁾. Las larvas se depositaron en botellas de cultivo con tapa ventilada. Los frascos fueron identificados con su fecha de cosecha, nombre de aislado y su concentración de L₃/ml. Las larvas se conservaron en refrigeración (6-10 °C) hasta su uso en las pruebas *in vitro* de inhibición de la migración y desenvaine, así como la de mortalidad de L₃ desenvainadas que son descritas posteriormente.

Dispersión de curcumina en polivinilpirrolidona (CUR/PVP)

Previo a los estudios *in vitro* y considerando la pobre solubilidad de la CUR^(16,40), se utilizó un procedimiento descrito previamente para mejorar la solubilidad y absorción de la cúrcuma E⁽²⁵⁾. El procedimiento consistió en combinar la cúrcuma E (52.28 % CUR; Laboratorios Mixim S.A. de C.V., Naucalpan, México) con PVP K30 (Agrimer K-30 Ashland, Columbus, Ohio, U.S.), en proporción 1:7. Esto permitió obtener una dispersión de cúrcuma E con una concentración final de CUR de 6.2 % (CUR/PVP). Este procedimiento se realizó en el Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (LEDEFAR) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

Preparación de soluciones madre de la dispersión CUR/PVP

Para las pruebas de inhibición de la eclosión de huevos (IEH), inhibición de la migración larvaria (IML) y mortalidad a las 72 h de L₃ sin vaina, se elaboró una solución madre con 32.4 mg de dispersión de CUR/PVP en 20 ml de agua purificada y se agitó con barra magnética durante 2 h. Posteriormente, la suspensión se centrifugó (BHG, Alemania) a 1,057 g durante 5 min y se utilizó el sobrenadante para las distintas concentraciones de los bioensayos. Para la prueba de inhibición del desarrollo larvario (IDL) se elaboró una solución madre con 64.8 mg de dispersión de CUR/PVP en 20 ml de agua purificada.

Determinación de la concentración de curcumina

Debido a la baja solubilidad de la CUR, en el sobrenadante utilizado para los bioensayos fue necesario determinar el contenido real en la suspensión. Para determinar la concentración de la suspensión se utilizó las metodologías descritas en la nota de Buchi No. 747⁽⁴¹⁾ y FSSAI⁽⁴²⁾. Brevemente, el sobrenadante utilizado se analizó con un espectrofotómetro UV/VIS (Lambda 25, Perkin Elmer, Beaconsfield, UK) a 425 nm de transmitancia. Se preparó una curva de calibración (0 - 6 mg/L) de CUR (estándar de Sigma Aldrich® cat. C7727 con 91 % de pureza) en etanol. Se utilizó etanol puro (Sigma Aldrich® cat. E7148) para corregir la lectura de fondo. Este procedimiento permitió determinar que la solución madre preparada con 32.4 mg de CUR/PVP contenía 11.3 µg CUR/ml y la solución madre de 64.8 mg de CUR/PVP contenía 23 µg CUR/ml.

Prueba de inhibición de eclosión de huevos

La prueba IEH se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Coles *et al*⁽⁴³⁾. La suspensión de huevos (200 huevos/ml) se distribuyó de manera homogénea en placas de 24 pozos (1 ml por pozo). Para esta prueba se utilizó la solución madre de CUR/PVP que contenía 11.3 µg/ml de CUR. Las concentraciones finales en los pozos se obtuvieron por

diluciones seriadas (%) de la solución madre: 2.3 (20 %), 4.0 (35 %), 5.7 (50 %) y 8.5 (75 %) $\mu\text{g/ml}$ de CUR en un volumen final de 2,000 μl . Se usaron 10 μl de solución de Lugol (0.5 % del volumen incubado) como control positivo de la prueba y 1,000 μl de agua purificada como control negativo. La placa antes mencionada se incubó a 28 °C en una estufa bacteriológica. Después de 48 h se detuvo la eclosión de los huevos mediante la adición de 50 μl de solución de Lugol por pozo. La prueba contó con dos réplicas y tres repeticiones para cada concentración. El contenido de cada pozo se contabilizó con la ayuda de cámaras de McMaster y un microscopio compuesto (objetivo 10x). En el fondo de la cámara se contabilizó el número de huevos morulados (HM), el número de huevos que contenían larvas que no eclosionaron (LNE) y el número de larvas L_1 presentes en la muestra, según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición de la eclosión} = \frac{\text{huevos sin eclosionar}}{\text{huevos sin eclosionar} + L_1} \times 100$$

Prueba de inhibición de migración larval

Esta prueba se realizó de acuerdo al procedimiento de Demeler *et al*⁽³²⁾ para evaluar IVM en dimetilsulfóxido. Para las pruebas con CUR/PVP, se realizaron las modificaciones que se describen a continuación. Se utilizó la solución madre de dispersión de CUR/PVP en agua purificada a una concentración de 11.3 $\mu\text{g CUR/ml}$. Las concentraciones finales en los pozos fueron a partir de diluciones seriadas (%) de la solución madre: 0, 0.6 (5 %), 1.1 (10 %), 2.0 (17.5 %), 3.7 (32.75 %), 5.7 (50 %) y 8.5 (75 %) $\mu\text{g CUR/ml}$. En una placa de 24 pozos se colocaron 0 - 500 μl de agua purificada más 0 - 750 μl de la solución madre en cada pozo. Para el control positivo se emplearon 100 μl (10 %) de Lugol, y para el control negativo 500 μl de agua purificada. Posteriormente, se agregaron en los pozos 250 μl (pozos con concentración final de 8.5 $\mu\text{g CUR/ml}$) o 500 μl (pozos restantes) de una suspensión de larvas a una concentración de 600 y 300 L_3/ml , respectivamente, alcanzando un volumen final de 1,000 μl . Cada concentración de CUR, así como controles positivos y negativos contó con con dos réplicas y tres repeticiones. Las placas se incubaron a 28 °C durante 24 h. Para la preparación de las placas de migración se colocaron 500 μl , de bacto-agar al 1.5 % alternando una fila con bacto-agar y otra fila vacía. Se colocó un tamiz (malla de 25 μm) en cada pozo de bacto-agar. Al final de la incubación con CUR, el contenido de L_3 en los pozos de trabajo y en los pozos controles, fue transferido a los tamices. Las placas de migración se incubaron a 28 °C durante 24 h para permitir que las L_3 migraran a través de los tamices. Finalizado el tiempo de incubación de las placas de migración se retiró el tamiz. De esta manera las L_3 migradas permanecieron en los pozos correspondientes. Las L_3 que no migraron (quedando dentro de los tamices) fueron transferidas a los pozos vacíos de las filas contiguas de la misma placa. Los tamices se lavaron con 1,000 μl de agua purificada para recuperar todas las L_3 en

el pozo correspondiente. Se agregó una gota de solución de Lugol en todos los pozos. El contenido de cada pozo se vertió en cámaras McMaster para realizar el conteo de L₃ de cada pozo. Se contó el número de L₃ migradas y L₃ no migradas de cada concentración y se calculó el porcentaje de migración utilizando la fórmula descrita por Demeler *et al*⁽³²⁾:

$$\% \text{ Inhibición de la migración} = \frac{\text{no migradas } L_3}{L_3 \text{ migradas} + \text{no migradas } L_3} \times 100$$

Prueba de inhibición del desenvaine larvario

Esta prueba se realizó de acuerdo al procedimiento de Jackson y Hoste⁽⁴⁴⁾. Se empleó una suspensión de 1,000 L₃ por ml. Para esta prueba se utilizó la solución madre de dispersión de CUR/PVP que contenía 23.0 µg CUR/ml. Las L₃ fueron incubadas durante 3 h a 23 °C en las diferentes concentraciones, obtenidas a partir de diluciones seriadas de la solución madre: 0.6 (2.5 %), 2.3 (10 %), 3.5 (15 %), 4.6 (20 %), 8.1 (35 %), 11.5 (50 %) y 17.3 (75 %) µg CUR/ml en tubos de 15 ml. Adicionalmente, se incubaron L₃ en las respectivas concentraciones de PVP K-30 para descartar cualquier actividad AH del polímero. Para el control positivo las L₃ se incubaron con LEV (120 mg/ml, Laboratorios Aranda S.A. de C.V., México). En el control negativo, las L₃ fueron expuestas a agua purificada. Posteriormente, se centrifugaron a 453 g durante 5 min y lavadas con agua purificada en tres ocasiones. Las larvas expuestas a los diferentes tratamientos se dividieron en cuatro alícuotas de 200 µl (200 L₃ en cada alícuota). Previo a la prueba de desenvaine con CUR/PVP, se realizó la respectiva curva de calibración para inducir el desenvaine gradual de cada aislado con diluciones de una solución de hipoclorito de sodio (2 %) y cloruro de sodio (16.5): 1/300, 1/400, 1/480, 1/600 y 1/800 en solución búfer de fosfatos (PBS, pH 7.4). El proceso de desenvaine fue monitoreado cada 20 min (minutos 0, 20, 40 y 60), en respectivas alícuotas de 50 µl (25-50 L₃) usando un microscopio con los objetivos de 10x y 40x. El desenvaine fue detenido mediante el flameado de los portaobjetos cubiertos por los cubreobjetos conteniendo las L₃. Se efectuaron cuatro repeticiones por cada una de las concentraciones evaluadas de CUR. El %IDL fue determinado de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición de desenvaine} = \frac{L_3 \text{ no desenvainadas}}{L_3 \text{ no desenvainadas} + L_3 \text{ desenvainadas}} \times 100$$

Prueba de evaluación de mortalidad sobre L₃ desenvainadas

Esta prueba se realizó de acuerdo al procedimiento de Reyes-Guerrero *et al*⁽³⁴⁾ con algunas modificaciones. Durante un periodo que abarcó desde las 3 hasta las 15 semanas de edad de

las L₃ de cada aislado de *H. contortus*, se realizaron cinco ensayos con L₃ desenvainadas con hipoclorito de sodio comercial al 0.187 %⁽⁴⁵⁾. Para esta prueba se utilizó la solución madre de dispersión de CUR/PVP que contenía 11.3 µg/ml de CUR. Las L₃ desenvainadas fueron expuestas a diferentes concentraciones 1.1 (10 %), 2.3 (20 %), 4.0 (35 %), 5.7 (50 %) y 8.5 (75 %) µg CUR /ml teniendo como control positivo solución de Lugol (10 µl) y control negativo agua purificada (50 µl). Cada concentración de CUR, controles positivos y negativos contó con dos réplicas de tres repeticiones cada una en placas de microtitulación de 96 pozos. Se agregaron 100 L₃, contenidas en 25 µl (pozos con concentración final de 8.5 µg/ml CUR) o en 50 µl (resto de los pozos) en un volumen final de 100 µl por pozo. Posteriormente se incubaron a 28 °C durante 72 h. Al final del periodo de incubación, se procedió a realizar el conteo de L₃ vivas y muertas en cada pozo, recogiendo la totalidad del pozo en gotas de 10 µl que fueron depositadas en portaobjetos para su conteo utilizando un microscopio óptico (objetivo 4x). Finalmente, se calculó el porcentaje de mortalidad utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Mortalidad} = \frac{L_3 \text{ muertas}}{L_3 \text{ muertas} + L_3 \text{ vivas}} \times 100$$

Análisis de datos

Los datos obtenidos en los ensayos con huevos (IEH) o L₃ (IML, IDL y mortalidad) se utilizaron para la obtención de las curvas de concentración-respuesta en una regresión log-logística con dos parámetros en el software RStudio, usando la extensión drc^(46,47). Se obtuvo la CE₅₀ e IC95% de cada prueba. El porcentaje de IEH, IML, IDL y mortalidad se analizaron respectivamente en un diseño completamente al azar mediante un ANOVA utilizando la función GLM de la extensión mass en el software RStudio^(42,43,48). Se incluyeron dos factores: aislado y concentración, el primero con tres niveles (Paraíso, FMVZ-UADY y CENID-SAI, INIFAP) y el segundo las concentraciones utilizadas de CUR para cada prueba. La comparación de medias se realizó con la prueba de Bonferroni en un nivel de significancia $P < 0.05$.

Previo a realizar el ANOVA descrito, se confirmó que los datos de eclosión, migración y desenvaine no cumplían con el supuesto de normalidad de acuerdo al test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Tampoco cumplían con la homogeneidad de varianza de acuerdo a la prueba de heterocedasticidad de Breusch-Pagan. Por lo tanto, los datos tuvieron que ser transformados mediante la transformación de Box-Cox con la extensión mass del programa mencionado^(47,48), posteriormente se realizó el análisis con los valores transformados una vez confirmados los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza. Sin embargo, los resultados se presentan como valores retro-transformados para facilitar su interpretación.

Resultados

Actividad de la CUR para inhibir el desarrollo del huevo y la eclosión de la L₁

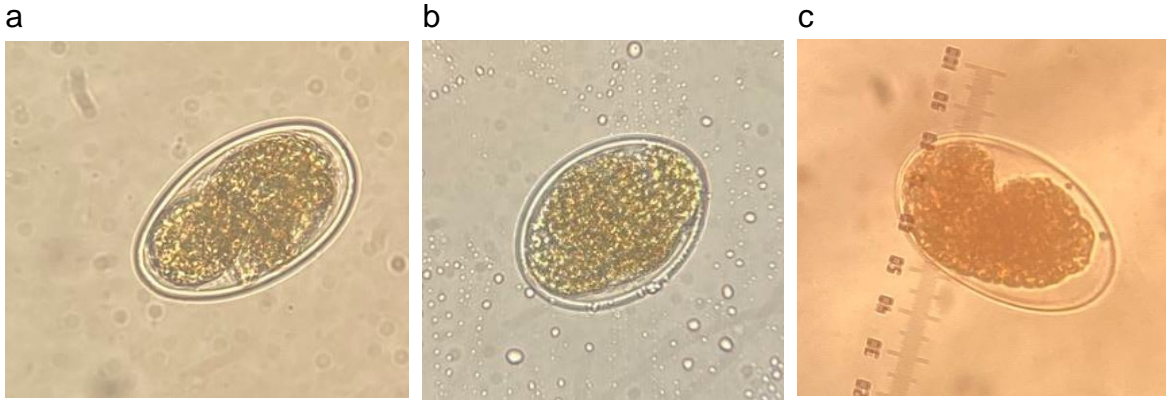
En el Cuadro 1 se presentan los promedios de inhibición de eclosión de huevos con distintas concentraciones de CUR para tres distintos aislados de *H. contortus*. De las cuatro distintas concentraciones de CUR utilizadas, solamente la concentración con 5.7 µg/ml de CUR alcanzó 99 % de inhibición de la eclosión en los aislados Paraíso y FMVZ-UADY, lográndose observar presencia de huevos morulados y huevos larvados (Figura 1 a y b). Sin embargo, a la mayor concentración evaluada, la inhibición no disminuyó de manera significativa para esos mismos aislados (Cuadro 1). En esta última concentración (8.5 µg CUR/ml) las L₁ mostraron cambios morfológicos que se podrían asociar a daño o inviabilidad de éstas (Figuras 2 a y b). En el aislado CENID-SAI, INIFAP los porcentajes de IEH fueron bajos (< 10 %) en todas las concentraciones utilizadas. Por tanto, no se pudo determinar la CE₅₀ para ninguno de los aislados de *H. contortus* evaluados.

Cuadro 1: Porcentaje de inhibición (promedio ± desviación estándar) de la eclosión de huevos tratados con distintas concentraciones de curcumina (CUR) en tres aislados de *Haemonchus contortus* con distinta susceptibilidad a antihelmínticos comerciales

	0 µg CUR/ml	2.3 µg CUR/ml	4 µg CUR/ml	5.7 µg CUR/ml	8.5 µg CUR/ml
Aislado					
Paraíso	5.1 ± 2.5	6.6 ± 3.6	16.4 ± 10.5	100 ± 0 ^a	34.8 ± 50.6
FMVZ-UADY	3.3 ± 0.9	8.3 ± 4.9	7.4 ± 2.4	99.8 ± 0.3 ^a	8.7 ± 3.5
CENID-SAI					
INIFAP	3.2 ± 1.2	6.5 ± 2.2	7.6 ± 2.1	6.5 ± 1.9 ^b	6.6 ± 1.2

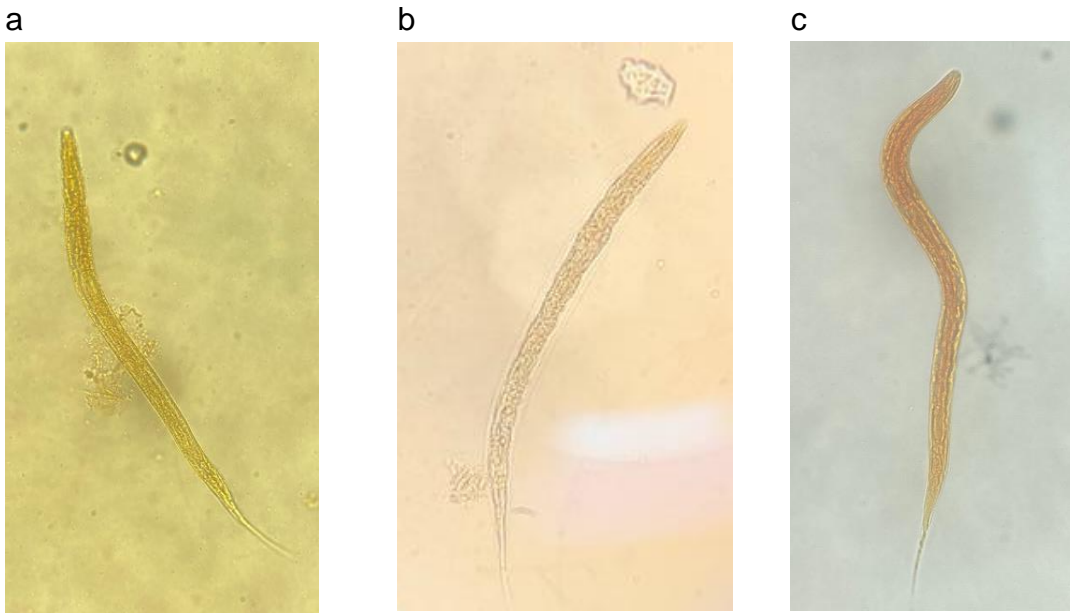
ab Literal diferente en la misma columna indica diferencia significativa entre aislados ($P < 0.05$).

Figura 1: Huevos de *Haemonchus contortus* aislado Paraíso (objetivo 40x) recuperados del bioensayo de inhibición de la eclosión a una concentración de 5.7 µg/ml de CUR



(a) huevo larvado y (b) huevo morulado. (c) Huevo recuperado del control positivo con tiabendazol.

Figura 2: Larvas L₁ de *Haemonchus contortus* aislado Paraíso recuperadas de bioensayos de inhibición de la eclosión de huevos (concentración de 8.5 µg/ml de CUR)



(a) larva degradada y (b) larva degradada con cutícula separada del cuerpo. (c) Larva L₁ normal recuperada de control negativo (objetivo 40x).

Actividad antihelmíntica de CUR sobre la migración de L₃ de tres aislados de *Haemonchus contortus*

En el Cuadro 2 se muestran los promedios de IML obtenidos con distintas concentraciones de CUR para tres aislados de *H. contortus*. De las seis distintas concentraciones utilizadas,

solamente la concentración de 5.7 µg/ml de CUR alcanzó porcentajes altos de inhibición de la migración con 64 % y 53 % para los aislados Paraíso y FMVZ-UADY, respectivamente, comparando con el control negativo ($P<0.05$). Por su parte, el aislado CENID SAI, INIFAP mostró menor inhibición de la migración con solo 20.3 %, y no fue diferente al control negativo. De modo semejante que en los bioensayos de IEH, no fue posible identificar la CE_{50} de CUR para inhibir la migración de los tres aislados evaluados.

Cuadro 2: Porcentaje de inhibición de migración (promedio ± desviación estándar) de L_3 tratadas con distintas concentraciones de curcumina (CUR) en tres aislados de *Haemonchus contortus* con distinta susceptibilidad a antihelmínticos comerciales

Aislado	0 µg CUR/ml	0.6 µg CUR/ml	1.1 µg CUR/ml	2.0 µg CUR/ml	3.7 µg CUR/ml	5.7 µg CUR/ml	8.5 µg CUR/ml
Paraíso	11.4 ± 3.6	15.2 ± 3.6	18.8 ± 14	13.2 ± 1.8	12.7 ± 3.8	64.1 ± 22.1 ^a	18.1 ± 7.1
FMVZ-UADY	11.1 ± 4.5	19.2 ± 10.5	10.8 ± 3.5	10.8 ± 3.5	12.1 ± 6.8	53 ± 23.1 ^a	18.9 ± 12.9
CENID-SAI	8.4 ± 8.4	9.3 ± 9.3	8.4 ± 8.4	8.7 ± 8.7	14.6 ± 14.6	13.6 ± 13.6	20.3 ± 20.3
INIFAP	3.1	7.4	2.7	2.4	4.3	2.4 ^b	12.8

^{ab} Literal diferente en la misma columna indica diferencia significativa entre aislados ($P<0.05$).

Actividad antihelmíntica de CUR sobre el desenvaine de L_3 de tres aislados de *Haemonchus contortus*

Se demostró que la CUR puede bloquear el desenvaine de las L_3 en las concentraciones de 8.1, 11.5 y 17.3 µg CUR/ml en rangos que van desde el 60 % hasta el 100 %. Las CE_{50} de los tres aislados fueron diferentes al no traslaparse sus respectivos $IC_{95\%}$. La menor CE_{50} se obtuvo con el aislado FMVZ-UADY ($CE_{50}= 1.9$ µg/ml, $IC_{95\%}$ 1.58-2.31), seguida de Paraíso ($CE_{50}= 3.2$ µg/ml, $IC_{95\%}$ 2.69-3.81) y el valor más alto fue el de CENID-SAI, INIFAP ($CE_{50}= 7.0$ µg/ml; $IC_{95\%}$ 6.58-7.43).

Actividad de CUR sobre la mortalidad de L_3 desenvainadas de tres aislados de *Haemonchus contortus*

Con respecto a los bioensayos de mortalidad de L_3 desenvainadas de los tres aislados de *H. contortus*, los promedios del porcentaje de mortalidad fueron menores al 10 % en todas las concentraciones evaluadas. Por lo tanto, no se registró un efecto de mortalidad sobre las L_3 desenvainadas de los tres aislados evaluados.

Discusión

Actividad antihelmíntica de CUR sobre eclosión de huevos de tres aislados de *Haemonchus contortus*

El presente trabajo demostró que la CUR no tiene efecto AH evidente sobre la eclosión de huevos de *H. contortus*. No se pudo determinar la CE₅₀ de CUR para ninguno de los aislados evaluados. Sin embargo, es de llamar la atención que se encontró un 99 % de disminución de la eclosión a la concentración de 5.7 µg CUR/ml para los aislados de Paraíso y FMVZ-UADY. Aparentemente, a esta concentración se presentaron las condiciones favorables para la solubilidad de la CUR en el agua y su difusión a través de las capas que protegen al huevo de *H. contortus*. Sin embargo, en la concentración mayor (8.5 µg CUR/ml) el efecto no fue evidente. Se desconoce por qué se presenta este fenómeno, pero se pudiera deber a la alta saturación del soluto en el líquido del bioensayo, o pudiera ser el resultado de un efecto hormético, al presentarse una respuesta bifásica en la que a bajas dosis no hay efecto y a dosis mayores sí se observan cambios, pero a medida que aumenta la dosis ésta no presenta el efecto esperado (en forma de J o de U invertida al graficarse)⁽⁴⁹⁾. Este fenómeno es tema central en la respuesta biológica, adaptativa y de reparación, y tiene implicaciones en farmacología y toxicología⁽⁵⁰⁾. Así, la hormesis se ha presentado a distintas concentraciones de curcumina en distintos tipos celulares^(51,52). Estudios previos han demostrado que un extracto metanol:agua (70:30) de *C. longa* mostró efecto AH contra los huevos de *H. contortus*, con una CE₅₀ de 69.75 µg/ml⁽²⁰⁾. Por otro lado, Cruz-Aguila⁽⁵³⁾ demostró el efecto de dos extractos del rizoma de *C. longa*, uno hidroalcohólico (1:9) y uno acuoso, sobre huevos de *H. contortus*, con CE₅₀ de 100.9 y 83.7 mg/ml, respectivamente. En los dos estudios que utilizaron extractos de *C. longa* no se determinó el papel de la CUR en el efecto AH reportado contra los huevos de *H. contortus*. En esos estudios se utilizaron solventes con distinta polaridad para la extracción de los compuestos y no se purificaron para la identificación de sus principales compuestos. Por lo tanto, estos autores solo suponen que se trata de un efecto de la curcumina, al ser ésta el principal componente en un extracto de *C. longa*. Sin embargo, es importante considerar la posibilidad de un efecto sinérgico al combinar diferentes curcuminoides como en el caso de *Toxocara canis* en el que la CUR mostró efecto AH sobre las L₂, pero el efecto se incrementó al combinar la CUR con desmetoxicurcumina, bisdesmetoxicurcumina y ciclocurcumina, sugiriendo que el sinergismo mejora la efectividad⁽⁵⁴⁾. Es importante recalcar que las L₁ observadas en los ensayos de IEH sugieren que la CUR podría ocasionar pérdida de la continuidad celular a nivel de órganos internos, cambios que pueden ser compatibles con la inviabilidad de las L₁. Estos efectos en la L₁ no habían sido reportados anteriormente y se sugiere que es necesario evaluar el efecto de la CUR sobre larvas de diferente estadio mediante la metodología de desarrollo larvario⁽⁵⁵⁾.

Actividad antihelmíntica de CUR sobre L₃ de tres aislados de *Haemonchus contortus*

En las pruebas de IML los resultados son semejantes a los obtenidos en las pruebas de IEH, ya que no se encontró un efecto AH de la CUR y no se pudo determinar la CE₅₀ para ninguno de los tres aislados evaluados. Tal como ocurrió en la prueba de IEH, los mejores porcentajes de inhibición en la migración de L₃ se obtuvieron con la concentración de 5.7 µg CUR/ml, aunque solo se alcanzaron porcentajes de inhibición entre 50 y 60 %. Al igual que en las pruebas de IEH, los resultados de la prueba de IML fueron erráticos posiblemente debido a las características propias de la CUR que podría presentar degradación al final de los bioensayos (48 h) ya que fue evidente el oscurecimiento de la solución, pasando de un amarillo claro al inicio del bioensayo hasta un color café en el interior de los pozos a las 48 h^(56,57). Hasta donde los autores tienen conocimiento, no existe algún antecedente de pruebas *in vitro* de IML para evaluar algún extracto de *C. longa* contra L₃ de *H. contortus* y que pudiera ayudar a explicar los resultados obtenidos.

Un resultado sobresaliente del presente estudio fue encontrar que la CUR bloquea el desenvaine de las L₃ de *H. contortus*. Este bloqueo del desenvaine, que se ha confirmado que ocurre en el líquido ruminal⁽⁵⁸⁾, pudiera ocasionar que las L₃ no puedan invadir las criptas en el abomaso, y consecuentemente no lograrían llegar a sus siguientes etapas, incluyendo la L₄, L₅ y adultos⁽⁵⁹⁾. Diversos estudios muestran que el bloqueo del desenvaine se asocia a la actividad de los polifenoles contenidos en los extractos de diferentes plantas obtenidos tanto de las hojas como de otras partes de diferentes especies de plantas^(8,60). La CUR es un polifenol relacionado estructuralmente con el ácido cafeico y ácido ferúlico⁽⁶¹⁾, los cuales también han sido evaluados contra *H. contortus* con los bioensayos de IEH e IDL⁽⁸⁾. El ácido ferúlico ha mostrado efecto ovicida a concentraciones de 200-400 µg/ml, y en la prueba de IDL los ácidos caféico y ferúlico presentaron actividad a concentraciones de 7.8 y 20.6 µg/ml, respectivamente. En el presente estudio se demostró que la CUR inhibe el desenvaine de las L₃ a concentraciones menores (< 7 µg/ml) que las de polifenoles mencionados anteriormente.

Se desconoce cuál es el mecanismo por medio del cual la CUR puede inhibir el desenvaine en los tres aislados de *H. contortus*. Pero es un hecho que la CUR mostró diferencias significativas en su capacidad de inhibir el desenvaine en los tres aislados estudiados. Se ha sugerido que la actividad de bloqueo del desenvaine depende de cómo interactúa la CUR con enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, biomoléculas y diferentes tipos de receptores en la vaina de los *H. contortus*⁽⁶²⁾. Recientemente, un estudio de metabolómica reveló un panel de metabolitos directamente responsables del desenvaine de las L₃, al estar asociado con aminoácidos, así como con las vías del metabolismo de las purinas y el piruvato en *H.*

contortus⁽⁶³⁾. Es evidente que se deberá investigar el papel de CUR en una o varias de estas vías metabólicas que pueden llevar a inhibir el desenvaine.

Por otro lado, el presente trabajo confirmó que la CUR no afecta la mortalidad de las L₃ sin vaina. Dado que la mortalidad causada por diferentes concentraciones de CUR sobre las L₃ desenvainadas nunca superó el 10 %. Esto confirma estudios previos que mostraron que el extracto de *C. longa* ocasiona una mortalidad menor al 10 % cuando se usa a 100 µg/ml⁽²⁰⁾. Un segundo estudio confirmó la ausencia de algún efecto sobre la mortalidad de L₃ de dos extractos de *C. longa*⁽⁵³⁾. Todos estos estudios contrastan con el trabajo de Nasai *et al*⁽²¹⁾, quienes proponen que un extracto etanólico de *C. longa* incrementa la mortalidad de las L₃ (78 %) a dosis de 200 mg/ml. Sin embargo, en este último estudio, se usó una gran cantidad de extracto y pudiera no ser viable de replicar en condiciones *in vivo*. Definitivamente, es importante recalcar que, aun cuando no se logró estimar una CE₅₀ de CUR para la mortalidad de las L₃, la prueba de eclosión de huevos demostró que la CUR es capaz de ocasionar cambios que pueden ser compatibles con la inviabilidad de las L₁ de *H. contortus*.

Finalmente, se ha corroborado que los aislados de *H. contortus* de distintas regiones geográficas presentan diferente susceptibilidad *in vitro* a los compuestos naturales de las plantas, tanto en la prueba de IEH como la de IDL^(64,65). Estos autores sugieren un proceso adaptativo por parte del parásito, para lograr su supervivencia aún en presencia de compuestos secundarios con actividad AH que son ingeridos por el rumiante durante el pastoreo. En este estudio fue posible demostrar que en los diversos bioensayos *in vitro* los aislados presentaron respuestas diferentes en las concentraciones de CUR evaluadas. Esto fue más evidente para las pruebas de IDL en las que los tres aislados fueron diferentes entre sí. Se desconoce por qué el aislado CENID-SAI, INIFAP presentó la menor sensibilidad al efecto de CUR sobre el desenvaine con respecto a los otros dos aislados de campo de Yucatán.

Conclusiones e implicaciones

La CUR no mostró actividad AH *in vitro* contra la eclosión de huevos, la migración de L₃ o la mortalidad de L₃ sin vaina de ninguno de los tres aislados (FMVZ-UADY, Paraíso, CENID-SAI, INIFAP). Sin embargo, se demostró un efecto sobre el desenvaine de las L₃, al igual que diferencias entre los tres aislados de *H. contortus* estudiados.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Agradecimientos

La presente investigación fue financiada por el CENID SAI, INIFAP a través del proyecto 20454534898 y forma parte del proyecto de Doctorado de Lisandro Encalada Mena en la FMVZ-UADY, México. Así también Lisandro Encalada Mena recibió una beca de estudios de posgrado del programa PRODEP-SEP (UNACAM-122). La producción de huevos y larvas de diferentes aislados de *H. contortus* fue obtenida del cepario de NGI de la FMVZ-UADY que es un producto del proyecto Cátedras CONAHCYT No. 692.

Literatura citada:

1. Encalada-Mena LA, Corbala-Bermejo JA, Vargas-Magaña JJ, García-Ramírez MJ, Uicab-Brito L, del Río-Rodríguez J. Gastrointestinal nematode prevalence in dual purpose systems in the municipality of Escárcega, Campeche, México. *Agrociencia* 2009;43(6):569–576.
2. Rinaldi L, Catelan D, Musella V, Cecconi L, Hertzberg H, Torgerson PR. *et al.* *Haemonchus contortus*: spatial risk distribution for infection in sheep in Europe. *Geospat Health* 2015;19:325–331.
3. Coop RL, Holmes PH. Nutrition and parasite interaction. *Int J Parasitol* 1996;26(8-9):951-962.
4. Arsenopoulos KV, Fthenakis GC, Katsarou EI, Papadopoulos E. Haemonchosis: A Challenging parasitic infection of sheep and goats. *Animals* 2021;11:1–28.
5. 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.
6. Rose H, Rinaldi L, Bosco A, Mavrot F, De Waal T, Skuce P. *et al.* Widespread anthelmintic resistance in European farmed ruminants: a systematic review. *Vet Rec* 2015;176(21):546-546.
7. Torres-Acosta JFJ, Hoste H, Sandoval-Castro CA, Torres-Fajardo RA, Ventura-Cordero J, González-Pech P. *et al.* The art of war against gastrointestinal nematodes in sheep and goat herds of the tropics. *Rev Académica Cienc Anim* 2019;17:39-46.
8. Mancilla-Montelongo G, Castañeda-Ramírez GS, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Borges-Argáez R. Evaluation of cinnamic acid and six analogues against eggs and larvae of *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 2019;270:25-30.

9. Lima CS, Pereira MH, Gainza YA, Hoste H, Regasini LO, de Souza Chagas AC. Anthelmintic effect of *Pterogyne nitens* (Fabaceae) on eggs and larvae of *Haemonchus contortus*: Analyses of structure-activity relationships based on phenolic compounds. *Ind Crops Prod* 2021;164:113348.
10. Nelson KM, Dahlin JL, Bisson J, Graham J, Pauli GF, Walters MA. The essential medicinal chemistry of curcumin. *J Med Chem* 2017;60(5):1620–1637.
11. Tsuda T. Curcumin as a functional food-derived factor: degradation products, metabolites, bioactivity, and future perspectives. *Food Funct* 2018;9(2):705-714.
12. Mimche PN, Taramelli D, Vivas L. The plant-based immunomodulator curcumin as a potential candidate for the development of an adjunctive therapy for cerebral malaria. *Malar J* 2011;10(Suppl 1):1-9.
13. Rauf A, Imran M, Orhan IE, Bawazeer S. Health perspectives of a bioactive compound curcumin: A review. *Trends Food Sci Technol* 2018;74:33–45.
14. Trujillo J, Chirino YI, Molina-Jijón E, Andérica-Romero AC, Tapia E, Pedraza-Chaverrí J. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings. *Redox Biol* 2013;1(1):448–456.
15. Xue X, Yu JL, Sun DQ, Zou W, Kong F, Wu J. *et al.* Curcumin as a multidrug resistance modulator - A quick review. *Biomed Prev Nutr* 2013;3(2):173–176.
16. Mahmood K, Zia KM, Zuber M, Salman M, Anjum MN. Recent developments in curcumin and curcumin based polymeric materials for biomedical applications: A review. *Int J Biol Macromol* 2015;81:877–890.
17. De Aguiar DP, Moscardini MBM, Morais ER, De Paula RG, Ferreira PM, Afonso A. *et al.* Curcumin generates oxidative stress and induces apoptosis in adult *Schistosoma mansoni* worms. *PLoS One* 2016;11(11):1–25.
18. Cervantes-Valencia ME, Alcalá-Canto Y, Sumano-Lopez H, Ducoing-Watty AM, Gutierrez-Olvera L. Effects of *Curcuma longa* dietary inclusion against *Eimeria spp.* in naturally-infected lambs. *Small Ruminant Res* 2016;136:27-35.
19. Singh A, Varshneya C, Telang RS. *In vitro* anthelmintic effect of *Curcuma longa*. *Indian Vet J* 2005;82(6):594–596.

20. Ullah S, Khan MN, Sajid MS, Muhammad G. Comparative anthelmintic efficacy of *Curcuma longa*, *Citrullus colocynthis* and *Peganum Harmala*. Glob Vet 2013;11(5):560–567.
21. Nasai NB, Abba Y, Abdullah FFJ, Marimuthu M, Tijjani A, Sadiq MA. *et al.* In vitro larvicidal effects of ethanolic extract of *Curcuma longa* Linn on *Haemonchus* larval stage. Vet World 2016;9(4):417–420.
22. Yallapu MM, Jaggi M, Chauhan SC. Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. Drug Discov 2012;17(1-2):71-80.
23. Rafiee Z, Nejatian M, Daeihamed M, Jafari SM. Application of curcumin-loaded nanocarriers for food, drug and cosmetic purposes. Trends Food Sci Technol 2019;88:445-458.
24. Paradkar A, Ambike AA, Jadhav BK, Mahadik KR. Characterization of curcumin–PVP solid dispersion obtained by spray drying. Int J Pharm 2004;271(1-2):281-286.
25. Hernandez-Patlan D, Solis-Cruz B, Pontin KP, Latorre JD, Baxter MF, Hernandez-Velasco X. *et al.* Evaluation of a solid dispersion of curcumin with polyvinylpyrrolidone and boric acid against *Salmonella enteritidis* infection and intestinal permeability in broiler chickens: A pilot study. Front Microbiol 2018;9:1–10.
26. Teodorescu M, Bercea M. Poly(vinylpyrrolidone) – A versatile polymer for biomedical and beyond medical applications. Poly Plast Technol Eng 2015;54(9):923–943.
27. Sadeghi F, Ashofteh M, Homayouni A, Abbaspour M, Nokhodchi A, Garekani HA. Antisolvent precipitation technique: A very promising approach to crystallize curcumin in presence of polyvinyl pyrrolidone for solubility and dissolution enhancement. Colloids Surf B 2016;147:258-264.
28. Guo L, Shi M, Song N, Wan Z, Liu H, Liu L. Anchorage of curcumin onto PVP enhances anti-tumor effect of curcumin. Med Chem Res 2019;28(5):646–656.
29. Sepúlveda-Vázquez J, Lara-Del Rio MJ, Vargas-Magaña JJ, Quintal-Franco JA, Alcaraz-Romero RA, Ojeda-Chi MM. *et al.* Frequency of sheep farms with anthelmintic resistant gastrointestinal nematodes in the Mexican Yucatán peninsula. Vet Parasitol: Reg Stud Rep 2021;24:1–7.
30. Mancilla-Montelongo MG, González-Pech PG, Miranda-Miranda DY, Castañeda-Ramírez GS, Encalada-Aguilar PA, Can Celis AC. *et al.* Targeted treatment strategies for the control of gastrointestinal nematodes in a goat flock with anthelmintic resistant worm populations and poor nutrition. Small Rumin Res 2023;227:107062.

31. Von Samson-Himmelstjerna G, Coles GC, Jackson F, Bauer C, Borgsteede F, Cirak VY. *et al.* Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. *Parasitol Res* 2009;105(3):825–834.
32. Demeler J, Küttler U, von Samson-Himmelstjerna G. Adaptation and evaluation of three different *in vitro* tests for the detection of resistance to anthelmintics in gastro intestinal nematodes of cattle. *Vet Parasitol* 2010;170:61–70.
33. Encalada-Mena LA, López-Arellano, R, López-Arellano ME, Mancilla-Montelongo M G, Sandoval-Castro CA, Olmedo-Juárez A. *et al.* Curcumin-PVP improves the *in vitro* efficacy of ivermectin against resistant and susceptible *Haemonchus contortus*. *Exp Parasitol* 2024;256:108670.
34. Reyes-Guerrero DE, Cedillo-Borda M, Alonso-Morales RA, Alonso-Díaz MA, Olmedo-Juárez A, Mendoza-de-Gives P. *et al.* Comparative study of transcription profiles of the P-glycoprotein transporters of two *Haemonchus contortus* isolates: Susceptible and resistant to ivermectin. *Mol Biochem Parasitol* 2020;238:111281.
35. Ramos-Bruno E, Sandoval-Castro CA, Torres-Acosta JFJ, Sarmiento-Franco LA, Torres-Fajardo R, Chan-Pérez, JI. *et al.* Nitrogen retention in hair sheep lambs with a gradient of *Haemonchus contortus* infection. *Vet Parasitol* 2021;296:109488.
36. Mendoza de Gives P, Torres-Acosta JF, Figueroa-Castillo JA, Soberanes-Céspedes N, Mancilla-Montelongo MG, Jasso-Villazul C. *et al.* Diagnóstico y control sustentable de nematodos gastrointestinales en ovinos y caprinos en la era de la resistencia antihelmíntica. Primera ed. Mérida, Yucatán, México: Editorial Universidad Autónoma de Yucatán; 2023.
37. Bauer BU, Pomroy WE, Gueydon J, Gannac S, Scott I, Pfister K. Comparison of the FLOTAC technique with the McMaster method and the Baermann technique to determine counts of *Dictyocaulus eckerti* L₁ and strongylid eggs in faeces of red deer (*Cervus elaphus*). *Parasitol Res* 2010;107:555-560.
38. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF). Manual of veterinary parasitological laboratory techniques. 3rd ed. London. Her Majesty's Stationery Office (HMSO); 1986.
39. van Wyk JA, Mayhew E. Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide. *Onderstepoort J Vet Res* 2013;80(1):1–14.

40. Liu W, Zhai Y, Heng X, Che FY, Chen W, Sun D. *et al.* Oral bioavailability of curcumin: problems and advancements. *J Drug Target* 2016;24(8):694–702.
41. Buchi (2021) Application note No. 747/2021. Determination of curcuminoids in turmeric powder.
https://assets.buchi.com/image/upload/v1623829658/pdf/ShortNotes/SN_747_2021_Determination_of_Curcuminoids_in_turmeric_powder.pdf.
42. Food Safety and Standards Authority of India (FSSAI). Manual of methods of analysis of foods: spices, herbs and condiments. New Delhi, Government of India, Ministry of Health and Family Welfare; 2012.
43. Coles GC, Jackson F, Pomroy WE, Prichard RK, Von Samson-Himmelstjerna G, Silvestre A. *et al.* The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 2006;136(3–4):167–185.
44. Jackson F, Hoste H. *In vitro* methods for primary screening of plant products for direct activity against ruminant nematodes. In: Vercoe PE, *et al* editors. *In vitro* screening of plant resources for extra- nutritional attributes in ruminants: Nuclear and related methodologies. Springer;2010:25–45.
45. Liébano-Hernández E, López-Arellano ME, Vázquez-Prats V, Mendoza de Gives P. Cryopreservation of infective larvae of *Haemonchus contortus*. *Rev Latinoam Microbiol* 1996;38(2):111-114.
46. Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D. Dose-response analysis using R. *PLoS One* 2015;10(12):1–13.
47. R Core Team. A language and environment for statistical computing Vienna, Austria. 2020.
48. Ripley B, Venables B, Bates DM, Hornik K, Gebhardt A, Firth D, Ripley MB. Package ‘mass’. *Cran R* 538. 2013;113-120.
49. Calabrese EJ. Hormesis: path and progression to significance. *Int J Mol Sci* 2018;19(10):2871.
50. Calabrese EJ, Mattson MP. How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine?. *NPJ Aging Mech* 2017;3(1):13.

51. Moghaddam NSA, Oskouie MN, Butler AE, Petit PX, Barreto GE, Sahebkar A. Hormetic effects of curcumin: What is the evidence? *J Cell Physiol* 2019;234(7):10060–10071.
52. Rainey NE, Moustapha A, Petit PX. Curcumin, a multifaceted hormetic agent, mediates an intricate crosstalk between mitochondrial turnover, autophagy, and apoptosis. *Oxid Med Cell Longev* 2020;3656419.
53. Cruz-Aguila J. Pruebas *in vitro* de extractos vegetales contra *Haemonchus contortus* [tesis licenciatura]. México, Tabasco: Universidad Autónoma Chapingo; 2018.
54. Kiuchi F, Goto Y, Sugimoto N, Tsuda Y, Akao N, Kondo K. Nematocidal activity of turmeric: synergistic action of curcuminoids. *Chem Pharm Bull* 1993;41(9):1640–1643.
55. Olmedo-Juárez A, Rojo-Rubio R, Arece-García J, Salem AZ, Kholif AE, Morales-Almaraz E. *In vitro* activity of *Pithecellobium dulce* and *Lysiloma acapulcensis* on exogenous development stages of sheep gastrointestinal strongyles. *Ital J Anim Sci* 2014;13(4):3104.
56. Li B, Konecke S, Wegiel LA, Taylor LS, Edgar KJ. Both solubility and chemical stability of curcumin are enhanced by solid dispersion in cellulose derivative matrices. *Carbohydr Polym* 2013;98(1):1108-1116.
57. Rathnayaka RMMP, Madhusankha GDMP, Perera ODAN. Curcumin ethanolic extraction and its' stability in food applications. In 2019 From Innovation to Impact (FITI), 1-6.
58. Marin-Tun CG, Mancilla-Montelongo MG, Capetillo-Leal CM, Sandoval-Castro CA, Hoste H, Borges-Argáez R, Torres-Acosta JFJ. Adapting the *in vitro* rumen incubation method to evaluate the effect of a plant extract on the exsheathment inhibition of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Vet Parasitol* 2024;327:110135.
59. Sommerville RI. The exsheathing mechanism of nematode infective larvae. *Exp Parasitol* 1957;6(1):18-30.
60. Spiegler V, Liebau E, Hensel A. Medicinal plant extracts and plant-derived polyphenols with anthelmintic activity against intestinal nematodes. *Nat Prod Rep* 2017;34(6):627-643.
61. Hardman WE. Diet components can suppress inflammation and reduce cancer risk. *Nutr Res Pract* 2014;8(3):233-240.

62. Ali R, Rooman M, Mussarat S, Norin S, Ali S, Adnan M, Khan SN. A systematic review on comparative analysis, toxicology, and pharmacology of medicinal plants against *Haemonchus contortus*. *Front Pharmacol* 2021;12:644027.
63. Palevich N, Maclean PH, Subbaraj AK, Cao M. A multimodal metabolomics approach to elucidate the trigger components of rumen fluid for larval exsheathment in a model gastrointestinal parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. *bioRxiv* 2021. [preprint]
64. Chan-Pérez JI, Torres-Acosta JF, Sandoval-Castro CA, Hoste H, Castañeda-Ramírez GS, Vilarem G. *et al.* *In vitro* susceptibility of ten *Haemonchus contortus* isolates from different geographical origins towards acetone:water extracts of two tannin rich plants. *Vet Parasitol* 2016;217:53–60.
65. Chan-Pérez, JI, Torres-Acosta JFJ, Sandoval- Castro CA, Castañeda-Ramírez GS, Vilarem G, Mathieu C. *et al.* Susceptibility of ten *Haemonchus contortus* isolates from different geographical origins towards acetone:water extracts of polyphenol-rich plants. Part 2: Infective L₃ larvae. *Vet Parasitol* 2017;240:11-16.