



A1-203 Actividad antihelmíntica de extractos vegetales.

Schapiro, Javier^{1,2}; Morici, Gabriel^{1,2}; Di Ciaccio, Lucía^{3,5}; Salvat, Adriana³; Fortunato, Renée H.^{4,5,6} y Caracostantogolo, Jorge^{1,2}.

¹ Área de Parasitología, Instituto de Patobiología, CICVyA INTA Castelar; ² Cátedras de Parasitología y de Enfermedades Parasitarias de la Escuela de Veterinaria de la Universidad del Salvador; ³ Laboratorio de Toxicología, Instituto de Patobiología, CICVyA INTA Castelar. ⁴ Instituto de Recursos Biológicos, CIRN INTA Castelar. ⁵ CONICET. ⁶ Facultad de Agronomía y Ciencias Alimentarias, Universidad de Morón.

schapiro.javier@inta.gob.ar ; morici.gabriel@inta.gob.ar ; diciaccio.lucia@inta.gob.ar ; salvat.adriana@inta.gob.ar ; fortunato.renee@inta.gob.ar ; caracostantogolo.j@inta.gob.ar

Resumen

Las infecciones por nematodos gastrointestinales están ampliamente distribuidas y se consideran una de las principales causas de pérdidas en producción. La aplicación de tratamientos antihelmínticos es muy frecuente y su uso inadecuado trajo como resultado la selección de poblaciones de parásitos resistentes. Es conveniente introducir cambios en su modo de uso así como desarrollar herramientas alternativas al control químico. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antihelmíntico de 104 extractos de vegetales autóctonos sobre una cepa pura de *Haemonchus contortus* que es considerado el nematodo más patógeno que afecta a los ovinos. Se efectuaron ensayos *in vitro* (test de inhibición de la eclosión de huevos y test de inhibición de migración larval) que permitieron seleccionar 26 extractos vegetales con efecto antihelmíntico pertenecientes a las familias *Rubiaceae*, *Solanaceae*, *Zygophyllaceae*, *Polygonaceae*, *Leguminoaceae*, *Bignoniaceae*, *Anacardiaceae*, *Lamiaceae* y *Euphorbiaceae*.

Palabras-clave: extractos vegetales; antihelmíntico; *Haemonchus contortus*; *in vitro*.

Abstract

Gastrointestinal nematode infections are widespread and are considered a major cause of production losses. The use of deworming is very frequent and the misuse resulted in the selection of populations of resistant parasites. It is very important to introduce changes in their mode of use as well as develop additional tools to chemical control. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* anthelmintic effect of 104 native extracts plants against a pure strain of *Haemonchus contortus* which is considered the most pathogenic nematode that affects sheep. *In vitro* assays (egg hatch inhibition assay and larval migration inhibition assay) were performed and allowed select 26 extracts plants with anthelmintic effect belonging to the families *Rubiaceae*, *Solanaceae*, *Zygophyllaceae*, *Polygonaceae*, *Leguminoaceae*, *Bignoniaceae*, *Anacardiaceae*, *Lamiaceae* y *Euphorbiaceae*.

Keywords: vegetable extracts; anthelmintic; *Haemonchus contortus*; *in vitro*.

Introducción

Dentro de las enfermedades parasitarias que afectan a los ovinos en pastoreo, la gastroenteritis verminosa constituye un grave problema a nivel mundial, cuyas pérdidas directas están relacionadas con la merma de producción de carne, lana, leche, y, en casos extremos, con la muerte de los animales severamente afectados. Esta afección es ocasionada por nematodos parásitos pertenecientes a diversas familias y géneros que afectan el abomaso e intestinos delgado y grueso, dentro de las que se destaca la Trichostrongylidae (*Haemonchus*, *Teladorsagia*, *Trichostrongylus* y *Cooperia*) (Cordero del

Campillo y Rojo-Vázquez, 1999). En las últimas décadas el control antiparasitario tanto de pequeños como de grandes productores se basó casi exclusivamente en el uso de drogas antihelmínticas. El uso frecuente e indiscriminado (en varias ocasiones asociado a su bajo costo) condujo a la selección de poblaciones de nematodos resistentes y a la posibilidad de encontrar residuos en carne y leche, así como también un efecto aún no dimensionado sobre la fauna estercolera. Esta resistencia a los antiparasitarios se encuentra ampliamente distribuida y en algunos lugares torna ineficiente la producción animal, tal es el caso de establecimientos en donde hay ausencia de respuesta al tratamiento frente a todos los grupos químicos. Esta situación amerita plantear cambios en el modo de uso, así como también desarrollar herramientas alternativas o complementarias al control químico. En este sentido, la investigación de extractos de plantas para el control de parásitos en medicina veterinaria tuvo un crecimiento notorio en los últimos 20 años y desde entonces existe un marcado interés para considerarlo dentro de las estrategias no químicas para el control antiparasitario. Estas plantas son denominadas bioactivas, ya que una gran variedad de ellas como sus extractos, contienen compuestos químicos capaces de producir variados efectos terapéuticos, entre los que se informó sobre su capacidad como nematodocidas (Athanasiadou, et al., 2001; Niezen, et al., 2002; Githiori, et al., 2006; Molan, & Faraj, 2010). Dentro de ellas se destacan las plantas polifenólicas (*Lotus* spp., Zulla, entre otras) o la corteza de ciertos árboles (*Eucalyptus*, *Pinus*, *Acacia*, *Quebracho*, entre otros) que contienen diferentes concentraciones de taninos condensados en su composición. El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antihelmíntica de distintas concentraciones de extractos sobre los estadios de huevo y larva de una cepa pura de *H. contortus* para seleccionar posibles candidatos que pudieran sumarse al control de los parásitos mediante el test de eclosión de huevos (EHA: egg hatching test) y el test de inhibición de la migración larval (LMIA: larval migration inhibition assay). Estos extractos son provenientes de representantes de la flora nativa Argentina que crecen en las regiones fitogeográficas Yunga y Chaco. La selección realizada tiene como antecedente la bioactividad obtenida durante los estudios de prospección encarados entre los años 1993-2003 (Convenio INTA-Universidad de Arizona: Bioactive Agents from Dryland Plants of Latin America; INTA-Argentina/University of Arizona-USA: International Cooperative Biodiversity Group -ICBG-).

Metodología

Lugar de la prueba y período de estudio

Esta experiencia formó parte de un proyecto de investigación entre el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y la Universidad del Salvador. El procesamiento de las muestras de materia fecal y el desarrollo de las técnicas *in vitro* se efectuaron en el Área de Parasitología del Instituto de Patobiología, perteneciente al Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas. El período de estudio se extendió entre los años 2012 y 2014.

Plantas y extractos vegetales

En las regiones áridas y semiáridas del norte argentino se efectuó una recolección de especies nativas en búsqueda de principios activos de interés medicinal, agroquímicos, veterinario, etc. mediante el convenio previamente citado. El material biológico que mostró bioactividad crece de las provincias de Jujuy, Salta, Formosa, Chaco y Santiago del Estero, y para su análisis se recolectaron 5 kg de material fresco que representa 1 kg de materia seca de distintas partes de una misma especie (raíz, ramas, hojas, flores, frutos y corteza). La separación de cada parte de la planta tiene el objetivo de evaluar separadamente los efectos que puedan poseer. Asimismo para contar con autenticación taxonómica validada se herborizó 1 ejemplar de Herbario de cada especie con el objetivo de evaluar

independientemente los efectos en cada una de ellas. Las muestras recolectadas se desecaron a temperatura ambiente y luego fueron molidas. Para preparar los extractos, 20 gramos del material molido se mezcló con 200 ml de metanol hasta el día siguiente. Luego se filtró a través de papel y se llevó a sequedad en un evaporador rotatorio con vacío a una temperatura de 40°C. Los extractos secos fueron redissueltos en metanol, a una concentración de 80 mg de materia seca/ml. Una alícuota de esta solución se diluyó a 1/10 con dimetilsulfóxido (DMSO), para luego ser esterilizada por filtración a través de membranas de 0,45 µm (Minisart, Sartorius). La concentración final fue de 8 mg de materia seca/ml. Los extractos se conservaron a -70°C hasta su uso.

Test de eclosión de huevos

Se incubaron una cantidad conocida de huevos de nematodos gastrointestinales (NGI) de pocas horas de eliminados (frescos, no larvados) frente a concentraciones seriadas de un extracto con potencial actividad antihelmíntica (Coles et al., 1992; 2006; Coles, 2005; Molan et al., 1999; 2000).

Técnica de aislamiento de huevos

Los huevos se recolectaron a partir de materia fecal fresca mediante el uso de arneses de tela colocados en corderos infectados experimentalmente con una cepa pura de *H. contortus* que presentaron un recuento de huevos por gramo de materia fecal (HPG) superior a 2.000.

El soporte utilizado en esta técnica fueron placas de cultivo celular Falcon™ de 24 pocillos de fondo plano con tapa. Se evaluaron 6 concentraciones de cada extracto vegetal (250µg/ml; 125µg/ml; 62,5 µg/ml; 31,25 µg/ml; 15,62 µg/ml y 7,80µg/ml) con 3 réplicas cada una, además de un Control negativo (huevos en agua destilada) que se analizó por triplicado en forma simultánea y de un Control del efecto de DMSO. Inicialmente se agregaron en cada uno de los pocillos 20 µl de agua destilada con aproximadamente 100 huevos de *H. contortus*. Luego se les adicionaron las distintas concentraciones de extractos vegetales hasta alcanzar un volumen final de 2 ml en cada pocillo. Finalmente se agregaron los controles negativos. Se identificaron las placas y se acondicionaron en estufa por 24 hs a 27°C y 85% de HR para permitir que los huevos eclosionaran al estadio de L1. En cada pocillo se contabilizó la cantidad de huevos y de larvas L1 y se calculó el porcentaje de eclosión para cada dilución de extracto vegetal relacionando la cantidad total de L1 y de huevos. La fórmula empleada para calcular el porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos en cada concentración de extracto utilizada fue la siguiente:

$$\% \text{ de inhibición de la eclosión de huevos} = \frac{100 \times \text{Número de huevos}}{\text{Número de huevos} + \text{larvas}}$$

Test de inhibición de la migración larval

El LMIA se basa en medir la capacidad migratoria de las larvas infectivas (L₃) a través de una malla de 28 µm luego de haber estado en incubación con concentraciones seriadas de un extracto vegetal con potencial actividad antihelmíntica (Rabel et al., 1994). Se empleó un dispositivo de filtros realizado con tubos de acrílico transparente de 2 cm de largo y 8 mm de diámetro interno a los que se les adhirió una malla de nylon de 28 µm en uno de sus extremos que permite la migración de las larvas.

Procedimiento

Al igual que lo realizado en el test de inhibición de la eclosión de huevos, se evaluaron 6 concentraciones de cada extracto vegetal (250µg/ml; 125µg/ml; 62,5 µg/ml; 31,25 µg/ml; 15,62 µg/ml y 7,80µg/ml) con 3 réplicas cada una, además de un Control negativo (L₃ en agua destilada) que se analizó por triplicado en forma simultánea y un Control del efecto del

DMSO. En cada pocillo se colocaron aproximadamente entre 90 a 100 L3 infectivas contenidas en un volumen de 20 µl de agua destilada, a los que se les agregó las diluciones de extractos hasta alcanzar un volumen final de 2 ml en cada pocillo. Estas placas (placas de incubación) se llevaron a estufa para incubación por 24 hs a 24°C y 85% de HR. Se observó en microscopio invertido y se contabilizaron las larvas que migraron y las que no pudieron hacerlo. Finalmente se calculó el porcentaje de larvas no migradas con respecto al número total de larvas mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición de la migración larval} = \frac{100 \times \text{Número de larvas no migradas}}{\text{Número total de larvas}}$$

Resultados

Test de inhibición en la eclosión de huevos

Se evaluaron 53 extractos vegetales, y se observó una clara respuesta dosis dependiente, dado que a las más altas concentraciones (62,5 µg/ml) demostraron tener mejor efecto, alcanzando valores de 25% de inhibición de la eclosión de huevos. En la Tabla 1 se presentan discriminados por Familias las diferentes cantidades de extractos vegetales estudiadas en los cuales el porcentaje de inhibición en la eclosión de huevos de *H. contortus* resultó superior al 25% en las concentraciones más altas.

TABLA 1. Cantidad de extractos vegetales discriminados por Familias en los cuales porcentaje de inhibición en la eclosión de huevos resultó superior al 25% en las concentraciones más altas.

Familia	Cantidad de extractos vegetales con inhibición en la eclosión de huevos >25%	Total de extractos estudiados (n=53)
<i>Rubiaceae</i>	5	7
<i>Solanaceae</i>	4	20
<i>Zygophyllaceae</i>	4	8
<i>Polyganaceae</i>	0	4
<i>Leguminoaseae</i>	6	11
<i>Bignoniaceae</i>	1	2
<i>Anacardiaceae</i>	1	1

Test de inhibición en la migración larval (LMIA)

Los resultados concuerdan con lo observado en el test EHA en cuanto a que los porcentajes de inhibición de los 70 extractos vegetales estudiados se incrementaron con el aumento de las concentraciones, evidenciándose una clara respuesta dosis dependiente. En la Tabla 2 se presentan discriminados por Familias las diferentes cantidades de extractos vegetales estudiadas en los cuales el porcentaje de inhibición en la migración larval resultó superior al 25% en las concentraciones más altas.

TABLA 2. Cantidad de extractos vegetales discriminados por Familias en los cuales porcentaje de inhibición en la migración larval resultó superior al 25% en las concentraciones más altas.

Familia	Cantidad de extractos vegetales con inhibición en la migración larval >25%	Total de extractos estudiados (n=70)
<i>Solanaceae</i>	0	2
<i>Leguminoaseae</i>	5	41
<i>Bignoniaceae</i>	0	2
<i>Anacardiaceae</i>	0	1
<i>Lamiaceae</i>	0	1
<i>Euphorbiaceae</i>	0	3

Conclusiones

Se seleccionaron 26 extractos vegetales con efecto antihelmíntico. Una evaluación ulterior debería tener en cuenta: el efecto antihelmíntico y la inocuidad de concentraciones mayores a las utilizadas en estas experiencias, abundancia del vegetal en la naturaleza, palatabilidad, posibilidad de cultivo y posibilidad de incluirlo en formulaciones de administración practicable.

Referencias Bibliográficas

- Athanasiadou S, I Kyriazakis, F Jackson & RL Coop (2001). Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Veterinary Parasitology* 99: 205-219.
- Coles GC, F Jackson, WE Pomroy, RK Prichard, G Samson-Himmelstjerna, A Silvestre, MA Taylor & J Vercruysse (2006). The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology* 136: 167-185.
- Coles GC (2005). Anthelmintic resistance - looking to the future: a UK perspective. *Research in Veterinary Science* 78: 99-108.
- Coles GC, C Bauer, FHM Borgsteede, S Geerts, TR Klei, MA Taylor & PJ Waller (1992). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.). Methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of Veterinary importance. *Veterinary Parasitology* (44): 35-44.
- Cordero del Campillo M & FA Rojo Vázquez (1999). *Parasitología Veterinaria*. Editorial McGraw-Hill. Interamericana: 237-252.
- Githiori JB, S Athanasiadou & SM Thamsborg (2006). Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants *Veterinary Parasitology* 139: 308-320.
- Molan AL & AM Faraj (2010). The effects of condensed tannins extracted from different plant species on egg hatching and larval development of *Teladorsagia circumcincta* (Nematoda: Trichostrongylidae). *Folia Parasitologica* 57[1]: 62-68.
- Molan AL, GC Waghorn, BR Min & WC McNabb (2000). The effect of condensed tannins from seven herbage on *Trichostrongylus colubriformis* larval migration *in vitro*. *Folia Parasitologica* 47: 39-44.
- Molan AL, GC Waghorn & WC McNabb (1999). Condensed tannins and gastro-intestinal parasites in sheep. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association* 61: 57-61.
- Niezen JH, WAG Charleston, HA Robertson, D Shelton, GC Waghorn & R Green (2002). The effect of feeding Sulla (*Hedysarum coronarium*) or Lucerne (*Medicago sativa*) on lamb parasite burdens and development of immunity to gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology* 105: 229-245.
- Rabel B, R McGregor & PGC Douch (1994). Improved bioassay for estimation of inhibitory effects of ovine gastrointestinal mucus and anthelmintics on nematode larval migration. *International Journal of Parasitology* 24: 671-676.