

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EFFECTO ANTIHELMÍNTICO *in vitro* DE CINCO EXTRACTOS DE
LEGUMINOSAS TROPICALES SOBRE *Haemonchus contortus*.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

Elke von Son de Fernex

Asesores:

MVZ Dr. Miguel Ángel Alonso Díaz (CEIEGT-FMVZ-UNAM)

Ingeniero Agrónomo Dr. Braulio Valles de la Mora (CEIEGT-FMVZ-UNAM)

México, DF.

2011



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.

Médico Veterinario Zootecnista.

Alumno: Elke von Son de Fernex.

Sínodo de examen de tesis profesional.

MVZ Héctor Quiroz romero
MVZ-UNAM

Presidente.

MVZ Eduardo Posadas Manzano
MVZ-UNAM

Vocal.

MVZ. María Rebeca Acosta Rodríguez
MVZ-UNAM

Secretario.

MVZ. Miguel Ángel Alonso Díaz
MVZ-UNAM

Suplente.

MVZ. Janitzio Ariel Bautista Ordoñez
MVZ-UNAM

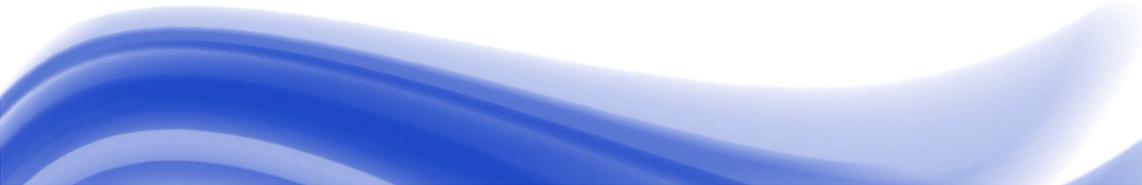
Suplente.



FÜR MEINE
ELTERN UND GESCHWISTER.

Ja, ich habe eine Karriere gemacht. Aber
neben meiner Familie erscheint
sie mir unbedeutend.

Lee Iacocca, 1924.



Ésta tesis profesional si bien ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación por mi parte y la de mis asesores, su realización no hubiese sido posible sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación citaré.

Quiero agradecer hoy y siempre a mi familia porque siempre confiaron en mí y si no fuese por el esfuerzo realizado por ellos, mis estudios no hubiesen sido posibles.

A mis padres el Dr. Federico von Son y Lisette de Fernex, que nunca dejaron de apoyarme y confiar en mí, que me han dado la fortaleza necesaria para seguir adelante. También quiero agradecer a mis hermanos: Heidi & familia, los Parlis, Fede & familia, Ulrich “el primo” y a mis Abuelos que sin saberlo siempre han sido junto con mis padres el pilar y la alegría de mi vida.

Gabriela Gastelum y Daniel Suarez, gracias por que más que mis amigos ustedes son mis hermanos y hemos estado juntos en cada momento importante de nuestras vidas.

Extiendo mi más sincero agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, al C.E.I.E.G.T., y a mis asesores de tesis el Dr. Miguel Ángel Alonso Díaz y Dr. Braulio Valles de la Mora, por ayudarme concluir mi carrera profesional en una universidad tan prestigiosa como lo es la UNAM.

Así mismo agradezco a todo el personal del C.E.I.E.G.T., administración, docentes y todos los trabajadores, quienes permiten el funcionamiento del centro, y que dentro de los ámbitos que a cada uno le competen han colaborado y me han brindado siempre una sonrisa.

Un agradecimiento especial al Dr. Miguel Ángel Alonso Díaz que más que ser el mejor asesor de tesis que pude tener, hoy es un gran amigo. Son tantas las cosas por agradecer que no quisiera dejar nada fuera, pero le agradezco de corazón sus enseñanzas, apoyo, confianza, paciencia y sobre todo su amistad. También quiero agradecer a su esposa Carolina por todas sus amables atenciones.

Agradezco de todo corazón a la Dra. Rebeca Acosta, Dr. Braulio VM, Dra. Ivette Rubio, Dra. Leticia Galindo y al Dr. Corro, que cada uno en su momento me brindó su apoyo, consejos y amistad incondicional durante mi estancia. Gracias ya que no solo impulsaron mi desarrollo profesional, pues más importantes fueron sus enseñanzas en el ámbito personal.

Le agradezco al Dr. Pedro Mendoza de Gives por su ayuda desinteresada ya que sin su apoyo éste trabajo no se hubiese podido realizar con la rapidez con la cual se concluyó, le agradezco sus enseñanzas y sobretodo la amistad que me brindo, la cual siempre tengo presente, así mismo quiero agradecer a su esposa Dra. Maru, al Dr. Liébano y todo su equipo de trabajo en el CENID- PAVET INIFAP.

A mis compañeros del C.E.I.E.G.T. (Daniel, Richi, George, Pelon, Lennin, Gadiel, Julián, Agustín, MACB, José Manuel, Rodrigo B., Mai, Cesar, Cinthia, Yutzil, Genaro & Fam., Marlene y Andy) y a todos los que en algún momento fuimos parte del 106 por hacer inolvidable mi estancia en el C.E.I.E.G.T., gracias por su apoyo en los momentos difíciles, por las risas, el descontrol y las enseñanzas. Gracias por ser mis cómplices y amigos desde el primer momento en que nos conocimos.

Así mismo quiero hacer un agradecimiento especial a Melvin porque a pesar de no tener mucho tiempo de conocernos, no se ha apartado de mi lado y ha sido para mí el apoyo más importante en ésta recta final.

También quiero dedicar unas líneas para agradecer a toda la gente de Martínez de la torre, Veracruz, que sin conocerme me acogieron como parte de su familia. Especialmente quiero agradecer profundamente a la Familia Reza & Callejas, Familia Manterola, a la Tía Vale, Mago & fam., la Tía Licha y Gloria)

En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que en algún momento voluntaria o involuntariamente influyeron en mi desarrollo tanto profesional como personal.

CONTENIDO.

| | Pág. |
|---|------|
| RESUMEN | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN. | 3 |
| 2. REVISIÓN DE LITERATURA. | 4 |
| 2.1. Nematodos Gastrointestinales y su impacto en la ganadería bovina. | 4 |
| 2.1.1. Ciclo biológico de <i>Haemonchus contortus</i> . | 5 |
| 2.2. Control de nematodos gastrointestinales (NGI). | 6 |
| 2.2.1. Control químico. | 6 |
| 2.3. Resistencia Antihelmíntica. | 7 |
| 2.4. Métodos alternativos de control de NGI. | 7 |
| 2.4.1. Control de parásitos en vida libre. | 8 |
| 2.4.1.1. Manejo del pastoreo. | 8 |
| 2.4.1.2. Control biológico. | 9 |
| 2.4.2. Control de parásitos dentro del hospedero. | 10 |
| 2.4.2.1. Inmunonutrición. | 10 |
| 2.4.2.2. Vacunación. | 10 |
| 2.4.2.3. Selección genética. | 12 |
| 2.4.2.4. Agujas de óxido de cobre. | 12 |
| 2.4.2.5. Plantas medicinales. | 13 |
| 2.4.2.5.1. Leguminosas forrajeras. | 14 |
| 2.5. Compuestos polifenólicos o taninos. | 15 |
| 2.5.1. Efectos benéficos y detrimentales de los taninos en rumiantes. | 15 |
| 2.5.2. Efecto antihelmíntico de los taninos/compuestos polifenólicos. | 17 |
| 2.5.3. Mecanismo de acción. Efecto directo e indirecto. | 18 |

| | |
|--|----|
| 3. JUSTIFICACIÓN. | 19 |
| 4. HIPÓTESIS. | 19 |
| 5. OBJETIVOS. | 20 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS. | 21 |
| 6.1. Área de estudio. | 21 |
| 6.2. Experimento <i>in vitro</i>. | 21 |
| 6.2.1. Leguminosas tropicales y extractos. | 21 |
| 6.2.2. Determinación de fenoles totales en los extractos. | 22 |
| 6.2.3. Larvas infectantes L ₃ de <i>Haemonchus contortus</i> . | 22 |
| 6.3. Bioensayos para determinar el efecto antihelmíntico de los extractos. | 22 |
| 6.3.1. Inhibición de la migración larvaria. | 22 |
| 6.3.2. Inhibición del desenvaine larvario artificial. | 23 |
| 6.4. Análisis estadístico. | 23 |
| 7. RESULTADOS. | 25 |
| 7.1. Compuestos polifenólicos de los extractos. | 25 |
| 7.2. Efecto del tratamiento sobre la inhibición del desenvaine larvario de larvas infectantes de <i>Haemonchus contortus</i> . | 25 |
| 7.3. Efecto del tratamiento sobre la inhibición de la migración larvaria (IML) de larvas infectantes de <i>Haemonchus contortus</i> . | 28 |
| 8. DISCUSIÓN. | 31 |
| 9. CONCLUSIÓN. | 34 |
| 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. | 35 |

RESUMEN.

von Son de Fernex Elke. **EFFECTO ANTIHELMÍNTICO *in vitro* DE CINCO EXTRACTOS DE LEGUMINOSAS TROPICALES SOBRE *Haemonchus contortus***. Dr. Miguel Ángel Alonso Díaz, Dr. Braulio Valles de la Mora.

Uno de los principales problemas de salud animal que enfrentan las unidades de producción bovina son las parasitosis causadas por nematodos gastrointestinales (NGI). Las leguminosas tropicales (LT) son una fuente importante de compuestos bioactivos que pueden tener propiedades antihelmínticas (AH). Los objetivos de éste trabajo fueron: i) evaluar el efecto antihelmíntico de cinco extractos liofilizados de leguminosas tropicales sobre la inhibición del desenvaine larvario de *Haemonchus contortus*; ii) evaluar el efecto AH de los cinco extractos liofilizados de leguminosas tropicales sobre la inhibición de la migración larvaria de *H. contortus* y iii) evaluar la participación de los compuestos polifenólicos en el posible efecto AH de las leguminosas tropicales mediante el uso de un inhibidor específico. Para evaluar el efecto AH de cada extracto, se utilizaron las pruebas de inhibición del desenvaine larvario (IDL) e inhibición de la migración larvaria (IML). En la prueba de IDL, las larvas infectantes (L₃) de *H. contortus* fueron expuestas a dos tratamientos (1200 µg de extracto/ml PBS y PBS como control). En la prueba de IML, las larvas fueron expuestas a dosis crecientes de cada extracto (150, 300, 600 y 1200 µg de extracto/ml PBS) y se utilizó PBS como control negativo y levamisol al 1% como control positivo. Los cinco extractos de LT inhibieron el proceso de desenvaine (P<0.01). En la prueba de IML, el extracto de *Cratylia argentea* CIAT 22386 tuvo un efecto antihelmíntico

dosis-dependiente contra *H. contortus* (L₃) (P<0.01). La restauración del desenvaine larvario así como de la migración larvaria L₃ a valores similares a los grupos control (después de adicionar el inhibidor de taninos), evidenció la participación de los taninos/compuestos polifenólicos en el efecto AH.

I. INTRODUCCIÓN.

Uno de los principales problemas de salud animal que enfrentan las unidades de producción bovina en México son las parasitosis causadas por nematodos gastrointestinales (NGI) (Köler, 2001). Los géneros de NGI que más afectan a los bovinos son: *Haemonchus sp.*, *Mecistocirrus sp.*, *Ostertagia sp.*, *Trichostrongylus sp.*, *Cooperia oncophora*, *Oesophagostomum sp.*, *Chabertia sp.* y *Bunostomum sp.* (Dimander *et al.*, 2003). Dichos nematodos presentan un ciclo biológico directo dividido en dos fases: I) Fase Pre-parasítica o de vida libre (huevo y fases larvarias 1, 2, 3) y II) Fase parasítica (Larvas 4, 5 y adulto).

El control de los NGI se ha basado en el uso de antihelmínticos (AH) químicos de las familias de los Benzimidazoles (ej. albendazol), Imidazotiazoles (ej. levamisol) y Lactonas macrocíclicas (ej. ivermectinas) (Nari *et al.*, 1996). Se ha demostrado que la dependencia al control químico de los NGI favorece la presencia de cepas de parásitos resistentes (Waller *et al.*, 1995; Sangster, 1999; Campos *et al.*, 1990, 1992; Torres-Acosta *et al.*, 2003). Actualmente existen diversos reportes de poblaciones de NGI resistentes a los AH en bovinos (Encalda Maena *et al.*, 2008; Guzmán *et al.*, 2010), por lo que se ha sugerido investigar nuevos métodos de control (Nisar Khan *et al.*, 2008).

El uso de plantas con propiedades medicinales se ha señalado como una de las principales alternativas al control químico de los NGI. Las leguminosas tropicales son una fuente importante de compuestos bioactivos, como los compuestos polifenólicos, que pueden tener propiedades AH (Makkar, 2003; Alonso-Díaz *et al.*, 2010).

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Nematodos gastrointestinales y su impacto en la ganadería bovina.

Las nematodosis del ganado bovino son uno de los principales problemas de salud animal, que afectan las unidades de producción bovina en el mundo (Köler, 2001). Las infecciones se presentan con mayor frecuencia en animales jóvenes, pero también afectan al ganado adulto y son responsables de fuertes pérdidas económicas. La interacción del ganado con los NGI es un hecho inevitable sobre todo cuando están bajo condiciones de pastoreo. El costo de las nematodosis puede clasificarse de la siguiente manera: i) con base en el costo directo para su control (utilización de AH y mano de obra), ii) por las pérdidas productivas y iii) por las muertes directas que ocasionan (McLeod, 1995; Charlier *et al.*, 2009).

En algunos países, las pérdidas de los NGI por mortalidad ascienden a 22 millones de dólares/año y las pérdidas productivas ascienden a 170 millones de dólares/año. En diversos estudios realizados en Sudamérica, se registraron pérdidas en la ganancia de peso del 30-40% (30-60 kg) (Entrocasso, 1988) y se afectaron los parámetros reproductivos como disminución en la tasa de fertilidad así como retraso a la pubertad en novillonas. Las pérdidas en producción láctea son de 200 kg/animal/lactación (Fiel *et al.*, 1991), afectando también la calidad de la canal por reducción de los tejidos y deposición de grasa (Garriz *et al.*, 1987).

Existe una gran variedad de NGI que pueden ser catalogados con base en su ciclo biológico y localización dentro del tracto gastrointestinal (TGI). Los NGI de ciclo directo pueden ser clasificados de la siguiente manera: i) parásitos que se

localizan en el abomaso: *Haemonchus sp*, *Mecistocirrus sp*, *Ostertagia sp* y *Trichostrongylus sp*, ii) parásitos del intestino delgado: *Trichostrongylus sp*, *Cooperia sp*, *Bonostomum sp*, *Nematodirus sp* y *Strongyloides sp* y iii) parásitos del intestino grueso: *Oesophagostomum sp*; *Chabertia sp* y *Trichuris sp*.

Las nematodosis por NGI pueden presentarse en curso agudo o crónico, y los efectos adversos sobre el metabolismo y comportamiento productivo del animal son similares. Se presenta, dependiendo de la severidad de la infección, anorexia, diarrea, mala absorción de nutrientes e incluso la muerte. De todos los parásitos antes mencionados, *Haemonchus contortus* es el NGI hematófago más importante y es responsable de severas pérdidas económicas en las unidades de producción en todo el mundo (Paolini *et al.*, 2005; Vatta y Lindberg, 2006), alcanzando tasas de mortalidad hasta de un 44% (Wanyangu *et al.*, 1997).

2.1.1 Ciclo biológico de *Haemonchus contortus*.

Haemonchus contortus fue identificado por primera vez por Karl Rodolphi en 1803 (Soulsby, 1982) y desde entonces han sido descritas 12 especies diferentes. Éste parásito pertenece a la familia *Trichostrongylidae*, posee un ciclo de vida directo y se localiza en el abomaso de los rumiantes infectados. La principal característica de los parásitos adultos, así como de las fases inmaduras L₄, es que se nutren de la sangre de su hospedero y causan micro hemorragias en la mucosa abomasal. Se ha estimado que un parásito adulto es capaz de consumir 0.05 ml de sangre/parásito/día (Clark *et al.*, 1962) por lo que una infección parasitaria puede ocasionar anemias severas, hipoproteinemia e incluso

la muerte de los animales. Otra característica de *H. contortus* es el alto potencial biótico de las hembras debido a que tienen la capacidad de producir de 5,000 a 20,000 huevos/hembra/día. Ésta misma característica ha sido asociada a la habilidad de *Haemonchus contortus* para desarrollar resistencia antihelmíntica.

2.2. Control de nematodos gastrointestinales (NGI)

2.2.1. Control químico.

El control de los NGI se ha basado, desde su descubrimiento hace 50 años, en el uso de AH de amplio espectro, pertenecientes a las familias de los Benzimidazoles (ej. albendazol), Imidazotiazoles (ej. levamisol) y Lactonas macrocíclicas (ej. ivermectina) (Nari *et al.*, 1996). Recientemente, y después de más de 25 años de investigación, se desarrolló una nueva molécula química que es un derivado del amino-acetonitrilo (AAD) y ha mostrado una eficacia del 100% contra NGI con resistencia múltiple (Steffan *et al.*, 2011).

El mecanismo de acción de dichos compuestos, puede resumirse en una alteración directa sobre el sistema neuromuscular de los parásitos, provocando una parálisis irreversible y por consiguiente su muerte y expulsión del hospedero. Éste método de control químico, se ha preferido en la mayoría de las unidades de producción debido a su facilidad de uso y eficacia contra las infecciones mixtas (Jackson y Miller, 2006). En principio, se creyó que la llegada de los AH químicos sería la solución a largo plazo para la problemática de parásitos gastrointestinales en el ganado; sin embargo, la rápida aparición de la resistencia antihelmíntica (RA) ha mostrado que depender de un método de control no es sustentable.

2.3. Resistencia antihelmíntica.

La resistencia antihelmíntica se define como la capacidad heredable de una población para tolerar dosis tóxicas de principios activos que normalmente son letales para una población susceptible (Torres Vásquez, 2007; Guzmán *et al.*, 2010). Este problema de RA ha sido ampliamente documentado en NGI de pequeños rumiantes. En bovinos, debido a que son capaces de montar una rápida y eficiente respuesta inmune contra los NGI (en comparación a los ovinos y caprinos) se supuso que la RA no implicaría un problema, pero en años recientes se han documentado varios casos de resistencia (Stafford and Coles, 1999; Suarez and Silvina, 2005; Pomroy, 2006; Soutello *et al.*, 2007; Suarez and Cristel, 2007).

2.4. Métodos alternativos de control de NGI.

En la última década aumentó la preocupación mundial sobre el uso de químicos y su impacto en el medio ambiente y la salud humana. Por ejemplo, en el 2006 la unión europea prohibió el uso de los antibióticos en la alimentación animal (Rochfort *et al.*, 2008). Éste tipo de movimientos, aunado a la creciente presencia de cepas de parásitos resistentes a AH químicos, ha orillado a los investigadores a la búsqueda continua de alternativas de control.

Jackson y Miller, (2006) clasifican a las diferentes alternativas de control de la siguiente manera:

Control de parásitos en vida libre (manejo de pastoreo, control biológico).

Control de parásitos dentro del hospedero (Inmunonutrición, selección genética, vacunación, forrajes bioactivos, agujas de cobre).

2.4.1. Control de parásitos de vida libre.

2.4.1.1. Manejo de pastoreo.

Para los NGI, la pradera representa su medio de desarrollo de huevos a larvas infectantes, y las fases larvianas permanecen ahí hasta ser ingeridas por algún hospedero. El principal objetivo del manejo de pastoreo es proveer a los animales pasturas con baja contaminación de NGI y puede conseguirse haciendo énfasis en tres puntos: i) reducir la densidad larvaria, ii) explotar la tasa natural de mortalidad de larvas infectantes y iii) acelerar la mortalidad larvaria (Torres-Acosta y Hoste, 2008). Dentro de las estrategias de manejo de pastoreo se encuentra la rotación de potreros que consiste en dividir un potrero en varias secciones de pastoreo dejando áreas inaccesibles para los animales, lo que permite romper con el ciclo vital de los NGI por inanición y por efecto de la temperatura y radiación solar (Torres-Acosta y Hoste, 2008). Se ha reportado que la mortalidad larvaria se presenta de cuatro a seis semanas post-contaminación (Barger, 1996). No obstante, éste periodo puede variar dependiendo de las condiciones medio ambientales a las cuales se encuentran expuestas.

2.4.1.2. Control biológico.

GrØnvold *et al.*, (1996) definen el control biológico como: *un método ecológico diseñado por el hombre para disminuir la población de parásitos o plagas a densidades subclínicas aceptables o a mantener esas poblaciones a niveles no dañinos usando antagonistas vivos.*

Posiblemente uno de los organismos más utilizados durante los últimos años para el control biológico de NGI ha sido el hongo nematófago *Duddigtonia flagrans* (GrØnvold *et al.*, 1993; Fernández *et al.*, 1997; Chandrawathani *et al.*, 2002; Mendoza de Gives *et al.*, 2006; Arroyo-Balán *et al.*, 2008; Brunet *et al.*, 2008; Casillas-Aguilar *et al.*, 2008; Ojeda-Robertos *et al.*, 2008; Galindo-Barboza *et al.*, 2010). Las clamidosporas de *D. flagrans* tienen la capacidad de sobrevivir al paso gastrointestinal de los rumiantes, germinar y colonizar heces frescas (Torres-Acosta y Hoste, 2008), así como formar trampas para capturar larvas infectantes de NGI. Dichas trampas se adhieren a la superficie del nematodo, penetran su cutícula y forman un bulbo infeccioso dentro del mismo, a partir del cual, las hifas tróficas crecen dentro del cuerpo y digieren su contenido (Nordbbring Hertz *et al.*, 1982).

2.4.2. Control de parásitos dentro del hospedero.

2.4.2.1 Inmunonutrición.

Una de las principales herramientas que puede utilizar el hospedero para contrarrestar los efectos negativos de los NGI, es la inmunidad (Jackson, 2008). Se conoce que un factor clave para montar una buena respuesta inmune contra los NGI es la nutrición, y los principales nutrientes involucrados son las proteínas, la energía y los minerales (Jackson, 2008). Houdijk *et al.*, (2005 y 2006) demostraron que la suplementación con proteína influyó en el desarrollo inmune de los animales contra los NGI. En México, se ha demostrado que la suplementación energética y proteica puede influir sobre el desarrollo inmunitario de los hospederos contra los NGI.

Durante un proceso infeccioso de NGI, el hospedero desarrolla una respuesta inflamatoria general, reconoce los antígenos parasitarios y genera la proliferación de inmunoglobulinas, leucotrienos, células mastocíticas y leucocitos globulares, cuya naturaleza es de origen proteico (Sandberg *et al.*, 2007). Por ende, al mejorar la nutrición del hospedero se puede mejorar su respuesta contra infestaciones parasitarias aumentando la resistencia y/o resiliencia (Hoste *et al.*, 2005).

2.4.2.2. Vacunación.

Para que una vacuna sea eficaz y proteja a los animales ante infecciones parasitarias, es necesario que el número de parásitos se reduzca dentro del

hospedero, lo cual puede ser posible al restar la capacidad de las larvas infectantes L₃ de establecerse o incrementar la mortalidad de parásitos adultos ya establecidos (Ketzis *et al.*, 2006). A pesar que durante los últimos 20 años se han desarrollado diversas vacunas para el control de NGI, aún no se ha conseguido elaborar una vacuna viable (Jackson *et al.*, 2009). No obstante, estos intentos han permitido identificar y purificar algunas aminoproteasas (H11) y metalo-proteasas (H-gal-GP) aisladas del intestino de larvas inmaduras L₄ y parásitos adultos de *H. contortus*. Éstas proteínas se conocen como antígenos ocultos y son los más protectivos que se han descubierto. La vacunación de ovinos con H11 y H-gal-GO disminuyó en 70% las poblaciones de parásitos adultos y 90% en la eliminación de huevos de NGI en heces (Knox *et al.*, 200). La aplicación de estos antígenos también se reflejó en un menor índice de anemia, diarreas y muertes de animales (LeJambre *et al.*, 2008).

Otros estudios, se han enfocado en la identificación de enzimas, producto de la excreción y secreción parasitaria. Se reportó que durante un proceso natural de infección *H. contortus*, produce dos proteínas de 15 y 24 kDa (Knox *et al.*, 200) las cuales son reconocidas serológicamente por el hospedero (ovinos) (Schallig *et al.*, 1997).

Posiblemente la principal limitante del uso de vacunas, es su acción específica contra un solo género parasitario cuando las infecciones de NGI son de naturaleza mixta e involucra varios géneros y especies de parásitos.

2.4.2.3. Selección genética.

La variabilidad genética entre razas de borregos, respecto a los niveles de resistencia parasitaria fue descrita por primera vez en 1937 por Stewart y colaboradores. El grado de resistencia de los rumiantes a los NGI ha sido medido mediante el conteo de parásitos adultos a la necropsia, y el conteo directo de huevos en heces, así como la resiliencia por medio del volumen del paquete de células sanguíneas y tasas de mortalidad (Mirkena *et al.*, 2010).

La eliminación de huevos por gramo de heces (hpgh), muestra la interacción directa que existe entre parásito-hospedero y se utiliza como un parámetro en un proceso de selección genética. Ésta característica fenotípica tiene un índice de heredabilidad moderada (0.29-0.44) (Beh y Maddox, 1996;). En Australia y Nueva Zelanda, se ha logrado el desarrollo de líneas de borregos resistentes a infecciones por NGI por medio de la selección de animales que excretan menores hpgh (Beh y Maddox, 1996; Knox, 2001). No obstante, también se ha reportado una correlación negativa entre la eliminación de hpgh y la productividad animal (Bisset *et al.*, 2001), por lo que se sugiere realizar estudios costo-beneficio, previos a la implementación de dicho manejo reproductivo.

2.4.2.4. Agujas de óxido de cobre.

El uso de agujas de óxido de cobre para el control de NGI, inició como un método para contrarrestar la deficiencia de cobre en rumiantes bajo condiciones de pastoreo. Sin embargo, se observó que los animales en tratamiento eliminaron menos huevos por gramo de heces.

El tratamiento se basa en la administración oral de cápsulas que contienen pequeñas agujas de cobre, las cuales llegan hasta el abomaso para permanecer en los pliegues de su mucosa y ejercer su acción AH. El pH ácido del abomaso, induce la liberación continua de iones de óxido de cobre durante varias semanas, los cuales son letales para los NGI, en particular los abomasales. A pesar de que el mecanismo de acción permanece desconocido, se sabe que la concentración de cobre crea un ambiente hostil que afecta directamente a los parásitos, evitando su establecimiento y son expulsados del organismo (Burke *et al.*, 2004). El efecto AH que ejerce sobre *Haemonchus contortus* ha sido evidenciado en diversos trabajos de campo, donde se demostró que provoca un desorden metabólico dentro del parásito, afecta su establecimiento dentro del hospedero, así como la fecundidad de las hembras (Knox, 2002).

2.4.2.5. Plantas medicinales

La Etnoveterinaria ha sido documentada en diferentes partes del mundo (Githiori *et al.*, 2006), y se refiere al uso de plantas medicinales (Barrau *et al.*, 2005) o sus compuestos bioactivos para el tratamiento de enfermedades. Hoy en día existen una gran variedad de plantas que permiten el tratamiento del ganado contra casi todas las enfermedades parasitarias (Athanasiadou *et al.*, 2007). Las leguminosas tropicales son una fuente importante de compuestos bioactivos, como los compuestos polifenólicos, que pueden poseer propiedades AH (Makkar, 2003; Alonso-Díaz *et al.*, 2010).

2.4.2.5.1 Leguminosas forrajeras

Las leguminosas forrajeras son el segundo grupo más importante de plantas utilizadas por el hombre, después de las gramíneas. Su atributo principal, desde el punto de vista de la ganadería de rumiantes, es el elevado contenido de proteína que poseen (14-28%) y las bajas concentraciones de fibra (< 40%) que se refleja en un mejor desempeño productivo de los animales (Lascano y Ávila, 1991).

Otra característica importante de las leguminosas tropicales es su rusticidad, que se define como la capacidad que poseen para desarrollarse adecuadamente en condiciones adversas (altas temperaturas, precipitación extrema y suelos de baja fertilidad). No obstante, una de las principales desventajas del uso de algunas leguminosas tropicales en la ganadería es la presencia de metabolitos secundarios de las plantas (MSP). Estos metabolitos le confieren protección a las plantas contra sus depredadores naturales incluida la herbívoría.

Durante los últimos años existió la controversia sobre la presencia de los MSP en la nutrición animal, debido a que pueden tener efectos tanto benéficos como detrimentales. Sin embargo, recientemente se ha dilucidado que éstos efectos pueden variar dependiendo de factores como la concentración y naturaleza de los MSP, la especie que los consume, la adaptación fisiológica, el estado fisiológico, así como la composición de la dieta (Makkar, 2003).

2.5. Compuestos polifenólicos o taninos.

El término tanino es un anglicismo derivado de la palabra “*tanning*” que se refiere a la preservación o curtido de las pieles (Waghorn, 2008). Los taninos son metabolitos secundarios de las plantas, cuya función es actuar como mecanismo de defensa contra: hongos, bacterias y herbívoros (Waghorn, 2008). Los taninos son sustancias polifenólicas de diverso peso molecular y complejidad, que poseen como característica principal la capacidad de unirse a proteínas en sustancias acuosas (Makkar, 2003). Debido a su estructura química han sido clasificados en dos grandes grupos: Taninos condensados (TC) e hidrolizables (TH). Los TC son polímeros de unidades de flavonoides unidos por ligaduras C-C (Schofield, 2001) y sus polímeros pueden variar en la longitud de cadena, desde dímeros hasta más de 20 unidades de flavonoides (Waghorn, 2008). Los TC, han sido determinados como proantocianidinas, debido a que el tratamiento con HCL/butanol, libera un brillante y rojo colorido de antocianidina. Los TH por lo contrario están compuestos por un azúcar central, generalmente glucosa, la cual se encuentra rodeada por varias unidades de ácido gálico (Mueller-Harvey, 2001).

2.5.1. Efectos beneficios y detrimentales de los taninos en rumiantes.

Se ha considerado que la ingesta de taninos puede afectar negativamente el consumo voluntario y el metabolismo ruminal (McSweeney, 2001), debido a su sabor astringente y reducción en la tasa de digestión (Makkar, 2003). Los efectos anti-nutritivos de los taninos se han asociado a la habilidad de los mismos para

formar complejos con la proteína dietaria y con polímeros como la celulosa, hemicelulosa, pectinas e incluso minerales, retardando su digestión (McSweeney, 2001). Sin embargo, dichos efectos se verán directamente relacionados con su porcentaje de inclusión en la dieta. Paolini *et al.*, en el 2004 clasifica el nivel de consumo de TC en tres categorías en función de los efectos fisiológicos sobre los animales: i) consumo del 2% no ocasiona ningún efecto adverso, ii) consumo del 3-6% efectos benéficos y iii) consumo mayor al 7% efectos dañinos. Las plantas tropicales, pueden tener una gran mezcla de compuestos polifenólicos, por lo cual es necesario considerar la actividad biológica de los mismos.

Debido a su amplia actividad biológica y farmacológica, también han sido reportados efectos benéficos para la nutrición y salud animal. La formación de complejos tanino-proteína (T-P) puede aumentar la proteína de sobrepaso a nivel intestinal. Las uniones T-P, se basan con mayor frecuencia en uniones hidrofóbicas e hidrógeno, y se ha demostrado que dichas uniones son pH dependientes, es decir, en condiciones de pH cercanas a neutras se forma el complejo T-P, y a pH menor de 3.5, como el del abomaso, se disocia el complejo y se libera la proteína (Min *et al.*, 2003). De esta forma, los taninos protegen la proteína dietaria de la degradación ruminal y ofrecen un mayor aporte a nivel intestinal (Min *et al.*, 2003).

Se ha encontrado que los TC también poseen efectos bactericidas (Akiyama *et al.*, 2001; Banso y Adeyemo, 2007), antioxidantes (Amarowicz *et al.*, 2000; Smirnova *et al.*, 2009), nematocidas (Hoste *et al.*, 2006; Alonso-Díaz *et al.*, 2008) e insecticidas (Fenny, 1970; Ayres *et al.*, 1997; Barbehenn, 2009); por lo

que la inclusión de taninos en la dieta de los animales puede tener efectos benéficos sobre la salud animal y su desempeño productivo.

2.5.2. Efecto Antihelmíntico de los taninos/compuestos polifenólicos.

Las primeras evidencias del efecto AH de los taninos se encontraron al comparar la eliminación de huevos en heces de pequeños rumiantes pastoreando leguminosas de clima templado con taninos (Hoskins *et al.*, 1999; Niezen *et al.*, 1995). A partir de estos reportes, diferentes investigadores se enfocaron a estudiar el efecto AH *in vitro* de los taninos mediante extractos acuosos de leguminosas. Las leguminosas que más se han estudiado y tuvieron propiedades AH atribuibles a los TC son: *Hedysarum coronarium* (Sulla) (Tzamaloukas *et al.*, 2005), *Ornobrychis viciifolia* (Sainfoin) (Hoste *et al.*, 2005; Paolini *et al.*, 2005; Heckendorn *et al.*, 2007; Brunet *et al.*, 2008), *Lotus corniculatus* (Birdfoot treefoil) (Niezen *et al.*, 1998; Marley *et al.*, 2003), *Lespedeza cuneata* (Sericea lespedeza) (Min *et al.*, 2004, 2005; Lange *et al.*, 2006; Shaik *et al.*, 2006; Joshi *et al.*, 2010), *Acacia pennatula*, *Lysilosoma latisiliquum* y *Piscidia piscipula* (Alonso-Díaz *et al.*, 2008), *Leucaena leucocephala* (Ademola *et al.*, 2005; Rojas *et al.*, 2006; Alonso-Díaz *et al.*, 2008), *Acacia gaumeri* (Alonso-Díaz *et al.*, 2008), *Acacia mearnsii* y *Carica papaya* (Cenci *et al.*, 2007), *Acacia mollissima* (Minho *et al.*, 2007), *Acacia karoo* y *Acacia nilotica* (Kahiya *et al.*, 2003), *Azadirachta indica* (Chagas *et al.*, 2008), *Brosimum alicastrum* y *Havardia albicans* (Alonso-Díaz *et al.*, 2008), *Arachis pintoi* y *Manihot sculenta* (Rojas *et al.*, 2006). Existen pocos trabajos en condiciones *in*

vitro, enfocados en el efecto AH de leguminosas forrajeras tropicales (Kahiya *et al.*, 2003; Ademola *et al.*, 2005; Rojas *et al.*, 2006; Cenci *et al.*, 2007; Minho *et al.*, 2007; Alonso-Díaz *et al.*, 2008).

2.5.3. Mecanismo de acción (efecto directo e indirecto).

En primera instancia, se planteó que el efecto AH de los taninos es indirecto, por la habilidad que poseen de aumentar la proteína de sobrepaso a nivel intestinal y aumentar la resistencia – resiliencia del hospedero contra las infecciones de NGI (Coop y Kyriazakis, 1999) (Ver sección 4.4.2.1). Posteriormente, se planteó la hipótesis que el efecto AH pudiera estar relacionado a un mecanismo directo de los taninos contra los parásitos gastrointestinales (Hoste *et al.*, 2006). Después de realizar varios trabajos *in vitro* e *in vivo*, se ha dilucidado que dicho efecto también está relacionado a la formación de complejos T-P. La cutícula de los nematodos, así como otros órganos (cavidad bucal, esófago, cloaca, vulva) poseen estructuras ricas en prolina, las cuales tienen gran afinidad a los taninos. Se presume que ésta característica pudiese explicar el efecto observado mediante microscopia electrónica en la cutícula parasitaria posterior al contacto con taninos (Hoste *et al.*, 2006). Existen trabajos de investigación *in vitro* e *in vivo* donde se ha evaluado el efecto de las plantas ricas en taninos (PRT) en la motilidad y desenvaine larvario, así como en reducción de huevos por gramo de heces (hpgh) y establecimiento de parásitos adultos en el hospedero (Joshi *et al.*, 2010; Alonso-Díaz *et al.*, 2008, 2008; Brunet *et al.*, 2008; Heckendorn *et al.*, 2007; Hoste *et al.*, 2006; Rojas *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2005; Min *et al.*, 2004, 2005; Paoilini *et al.*, 2003; Athanasiadou *et al.*, 2001).

3. JUSTIFICACIÓN.

El uso indiscriminado, y muchas veces la mala utilización de los AH químicos, ha favorecido la presencia de cepas de nematodos gastrointestinales resistentes a los antihelmínticos. La creciente emergencia de cepas multi-resistentes a los diferentes principios activos ha favorecido y motivado estudiar nuevas alternativas para el control de los parásitos en los rumiantes.

4. HIPÓTESIS.

Los extractos de las leguminosas forrajeras *Arachis pinto* CIAT 22160 (Cacahuete forrajero), *Gliricidia sepium* (Cocoite), *Cratylia argentea* Veranera, *Cratylia argentea* CIAT 22386, *Cratylia argentea* (Yacapani) tendrán efecto antihelmíntico *in vitro* contra larvas infectantes de *Haemonchus contortus*.

5. OBJETIVOS.

5.1. Objetivo General

Evaluar el efecto antihelmíntico *in vitro* de cinco leguminosas forrajeras sobre el control de *Haemonchus contortus*.

5.2. Objetivos Específicos

- 1) Evaluar el efecto antihelmíntico de cinco extractos liofilizados de leguminosas tropicales: *Arachis pintoii* CIAT 22160 (Cacahuete forrajero), *Gliricidia sepium* (Cocoite), *Cratylia argentea* Veranera, *Cratylia argentea* CIAT 22386, *Cratylia argentea* (Yacapani), sobre el bloqueo del proceso de desenvaine larvario de *H. contortus*.
- 2) Evaluar el efecto AH de los cinco extractos liofilizados de leguminosas tropicales, sobre la inhibición de la migración larvaria de *H. contortus*.
- 3) Evaluar la participación de taninos/compuestos polifenólicos en el posible efecto AH de las leguminosas tropicales.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. Área de estudio.

El presente trabajo, se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT), localizado en el municipio de Tlapacoyan, Ver., ubicado en el km 5.5 de la carretera federal Martínez de la Torre – Tlapacoyan, a una altura de 151 msnm. El clima de esta zona es cálido húmedo, con una temperatura y precipitación media anual de 23.4 °C y 1840 mm, respectivamente.

6.2. Experimento *in vitro*.

6.2.1. Leguminosas tropicales y extractos.

Se utilizaron 500 g de material vegetal (hojas frescas) de cada especie de las leguminosas: *Arachis pintoii* CIAT 22160 (cacahuate forrajero), *Gliricidia sepium* (Cocoite), *Cratylia argentea* (Yacapani), *Cratylia a. Veranera* y *Cratylia a. 22386*, del área experimental localizada en el predio La Soledad, perteneciente al CEIEGT. El material cosechado fue transportado en refrigeración al laboratorio de nutrición del CEIEGT, se secó en una estufa a 60°C durante 72 hrs, y posteriormente se molió la materia seca. De cada leguminosa, se realizó un extracto con acetona: agua (70:30) y ácido ascórbico (1%). Después, se utilizó un roto-evaporador para eliminar la acetona y se realizaron cuatro lavados con clorhidrato de metileno para eliminar pigmentos y grasas. Cada extracto fue congelado y posteriormente liofilizado (Alonso-Díaz *et al.*, 2008).

6.2.2. Determinación de fenoles totales en los extractos.

De cada uno de los extractos, se determinó el porcentaje de fenoles totales mediante la técnica de Folin-Ciocalteu (Makkar, 2003.)

6.2.3. Larvas infectantes de *Haemonchus contortus*.

Se obtuvieron 400,000 larvas infectantes (L₃) de *H. contortus* de un donador mono-específico del laboratorio de Helminología, del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria del INIFAP (CENID PAVET/INIFAP). Las larvas L₃ se obtuvieron por medio de coprocultivos de un ovino infectado con una cepa doble resistente de *Haemonchus contortus*.

Estas larvas fueron conservadas en refrigeración y se utilizaron como modelo en los bioensayos para determinar el efecto antihelmíntico de los extractos.

6.3. Bioensayos para determinar el efecto antihelmíntico de los extractos.

6.3.1. Inhibición de la migración larvaria.

El efecto antihelmíntico de cada extracto se evaluó mediante la prueba de inhibición de la motilidad larvaria (IML) (Rabel *et al.*, 1994). Aproximadamente 1000 L₃ de *H. contortus*/ml PBS fueron expuestas a dosis crecientes de cada extracto: 150 µg/ml; 300 µg/ml; 600 µg/ml; 1200 µg/ml. En cada bioensayo se utilizó un control negativo (PBS) y un control positivo (Levamisol al 1 %). Se realizaron cuatro réplicas para cada tratamiento (dosis de extractos y controles).

Para determinar la participación de los taninos/compuestos polifenólicos en el posible efecto AH de cada extracto, se realizaron otros cuatro bioensayos donde se utilizó 1200 µg extracto/ml PBS con y sin la adición de 500 mg de Polietilenglicol (PEG), que se ha utilizado como un bloqueador específico de los taninos (Makkar *et al*, 2003).

6.3.2. Inhibición del desenvaine larvario artificial.

Se utilizó la prueba de desenvaine larvario para evaluar el efecto de los extractos sobre la biología de *H. contortus*. Aproximadamente 1000 L₃ de *H. contortus*/ml de PBS fueron sometidas a incubación durante 3 horas a cada uno de los extractos (1200 µg/ml PBS). Se utilizó un grupo control que consistió en incubar la misma cantidad de larvas en PBS. Posteriormente, ambos grupos fueron sometidos a un proceso artificial de desenvaine, exponiéndolas directamente a una solución de Hipoclorito de sodio (2% w/v) previamente diluido en PBS a una relación 1:300 (Alonso-Díaz *et al*, 2008). El proceso de desenvaine se observó en intervalos de 10 minutos durante 60 minutos mediante microscopía directa (40x). Se realizaron seis réplicas para cada extracto.

6.4. Análisis estadístico.

Para evaluar el efecto del tratamiento de cada extracto de leguminosa sobre el desenvaine larvario se utilizó un modelo lineal general (STATGRAPHICS Plus v.5.1). El efecto del tratamiento, con los extractos de *Cratylia a. Veranera*, *Cratylia argéntea*, *Gliricidia sepium* y *Arachis pintoii*, sobre la inhibición de la migración larvaria (IML) de *H. contortus* se evaluó mediante la prueba de Kruskal-Wallis

(STATGRAPHICS Plus v.5.1). La evaluación del efecto del tratamiento con *Cratylia argentea* CIAT 22386, sobre la IML se analizó con un modelo lineal general (STATGRAPHICS Plus v.5.1). Se utilizó un valor de $P < 0.05$ para determinar diferencias estadísticamente significativas entre medias.

7. RESULTADOS.

7.1. Compuestos polifenólicos de los extractos.

El extracto con la mayor cantidad de Fenoles totales (TT) fue *Arachis pintoii* CIAT 22160 seguido de *Cratylia argentea* Veranera (Cuadro 1).

Cuadro I. Determinación de Fenoles totales (FT).

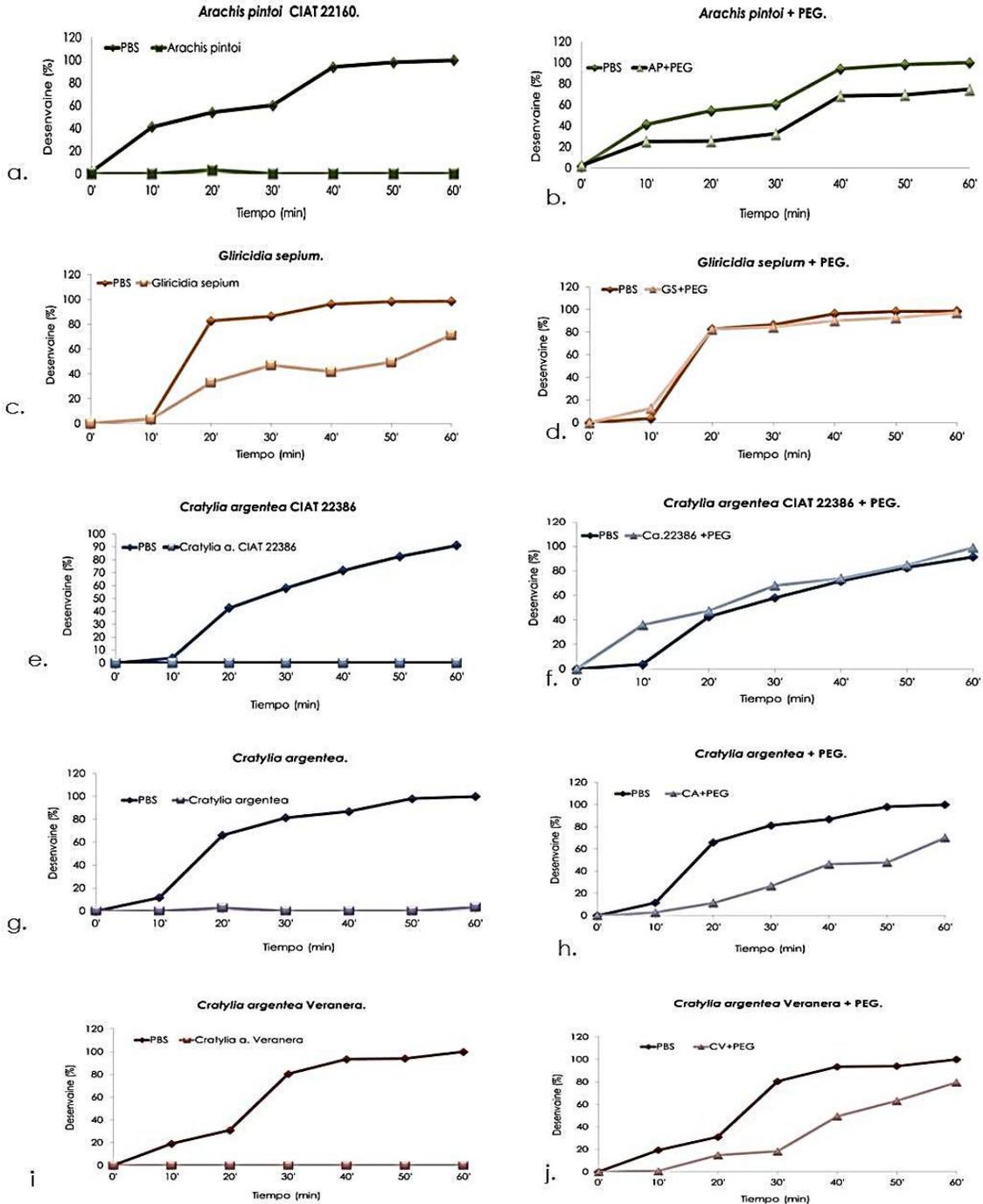
| Nombre | g/100g |
|-------------------------------------|--------|
| | FOLIN |
| <i>Arachis pintoii</i> CIAT 22160 | 11.84 |
| <i>Cratylia argéntea</i> CIAT 22386 | 6.18 |
| <i>Gliricidia sepium</i> | 4.32 |
| <i>Cratylia argéntea</i> | 6.24 |
| <i>Cratylia argéntea</i> Veranera | 7.42 |

7.2. Efecto del tratamiento sobre la inhibición del desenvaine larvario de larvas infectantes de *Haemonchus contortus*.

El desenvaine larvario de *Haemonchus contortus* (L₃) en los grupos control (PBS) fluctuó del 80% al 100% después de 60 minutos de ser sometido al desenvaine artificial; pero cuando las L₃ de *H. contortus* se incubaron durante tres horas a una dosis de 1200 µg de cada extracto/ml de PBS, el tratamiento de las cinco plantas bloqueó el proceso de desenvaine (P<0.01) (Figura 1. a, c, e, g, i).

Cuando el tratamiento 1200 µg/ml de PBS de cada planta, se combinó con un bloqueador específico de taninos (PEG; 2400 µg/ml de PBS) el efecto antihelmíntico, medido mediante el bloqueo del desenvaine larvario, se restauró a valores similares a los del grupo control ($P > 0.05$) (Figura 1. b, d, f, h, j).

Figura 1. Efecto *in vitro* de cinco extractos de leguminosas tropicales en el proceso de desvaine larvario artificial de *Haemonchus contortus* en su fase infectante L₃, incubadas a 3 hr y dosis de 1200 ug/ml PBS (a, c,e,g,i), en comparación con el mismo tratamiento más la adición de PEG (b,d,f,h,j).



7.3. Efecto del tratamiento sobre la inhibición de la migración larvaria (IML) de larvas infectantes de *Haemonchus contortus*.

En los bioensayos de IML el porcentaje de migración de L₃ de *Haemonchus contortus* en el grupo control negativo (PBS) fluctuó del 55.25% al 77.7%.

La Figura 2 presenta el efecto de los cinco extractos de las leguminosas en estudio, sobre el porcentaje de inhibición de la migración larvaria de *Haemonchus contortus* en su fase L₃. Se observa que todos los extractos, excepto el correspondiente a *Arachis pintoi* CIAT 22160 y *Cratylia argentea*, registraron un efecto inhibitorio para la migración larvaria, en comparación con el tratamiento control negativo correspondiente a cada leguminosa evaluada. El extracto de *Cratylia argentea* CIAT 22386 presentó un efecto antihelmíntico dosis-dependiente ($P < 0.01$) contra *Haemonchus contortus* (L₃) (Figura 2 c). El máximo efecto que se encontró en el cultivar Veranera y en Coccoite, fue con valores de 39.2% y 35.9% (relativo al control con PBS) a la dosis máxima de 1200 µg extracto/ml PBS.

En el segundo ciclo de bioensayos de IML (con y sin la adición de PEG), se observó que el efecto AH de los extractos de *Cratylia argentea* CIAT 22386 y *Gliricidia sepium* a una dosis de 1200 µg/ml ($P < 0.05$) se re-estableció a valores de migración larvaria similares a los del grupo control (PBS) cuando se adicionó PEG durante la incubación ($P > 0.05$) (Figura 3 a b).

Figura 2. Efecto *in vitro* de cinco extractos de leguminosas tropicales sobre la inhibición de la migración larvaria (IML) de *Haemonchus contortus* en su fase infectante L₃.

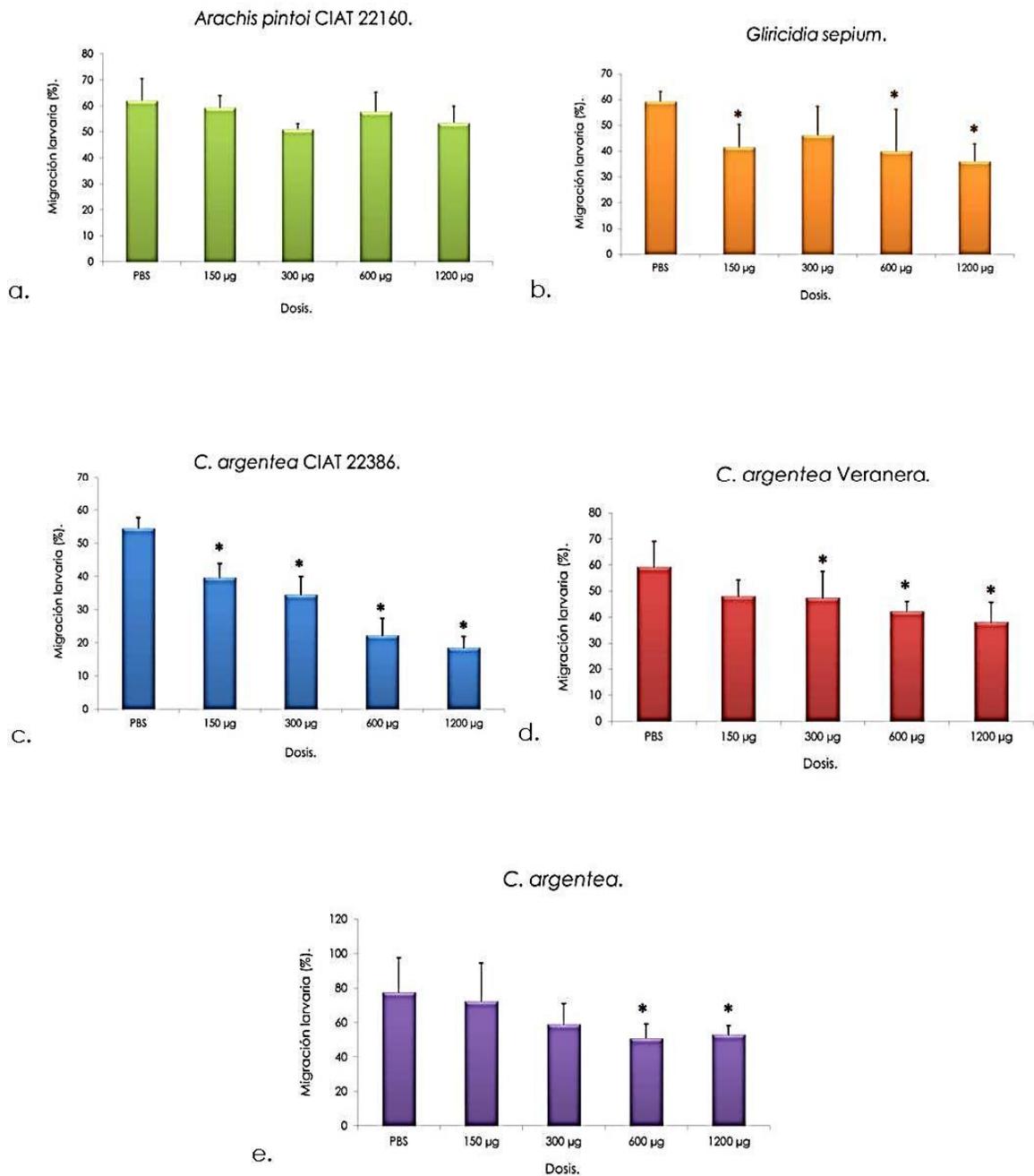
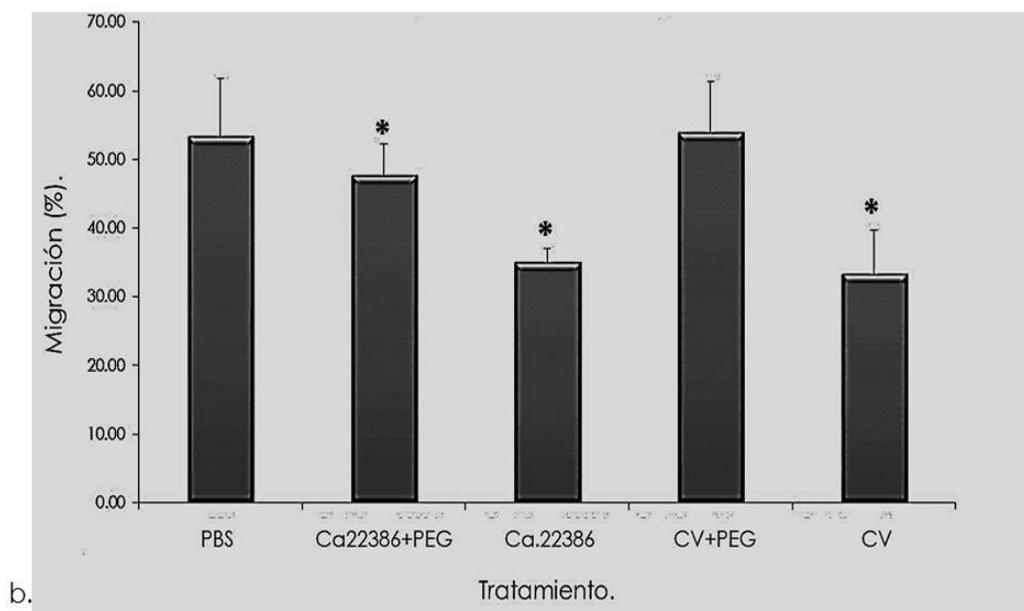
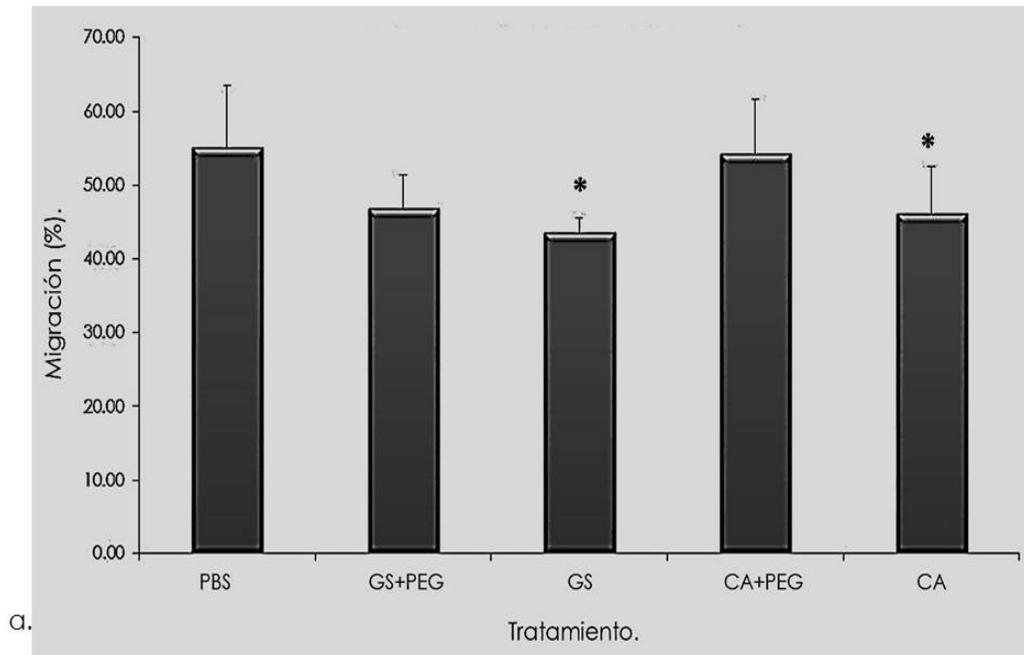


Fig. 3. Efecto de los extractos de *Gliricidia sepium* (GS), *Cratylia argentea* (CA), *Cratylia a. 22386* (Ca22386), *Cratylia a. Veranera* (CV), sobre la inhibición de la migración larvaria en larvas infectantes (L₃) de *Haemonchus contortus*. *indica efecto significativo comparado con el grupo control (P < 0.05).



8. DISCUSIÓN.

El efecto antihelmíntico de plantas ricas en taninos o en compuestos polifenólicos sobre NGI ha sido documentado principalmente con leguminosas de clima templado y con leguminosas arbóreas en el trópico (Molan *et al.*, 2002; Hoste *et al.*, 2006; Alonso-Díaz *et al.*, 2008 a, 2008 b). A pesar de su gran potencial nutritivo, rusticidad al medio y producción de biomasa, las leguminosas forrajeras en el trópico han sido poco evaluadas sobre el control de NGI. El primer objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de cinco extractos de leguminosas tropicales (*Arachis pintoi* CIAT 22160, *Gliricidia sepium*, *Cratylia a.* CIAT 22386, *Cratylia argentea* y *Cratylia a. Veranera*) sobre la inhibición del desenvaine larvario en *Haemonchus contortus* (L₃). Los cinco extractos inhibieron el desenvaine de las larvas (P <0.01). Estos resultados son similares a los de otros autores quienes reportaron una total o parcial inhibición del desenvaine por efecto de extractos de plantas ricas en taninos (Bahaud *et al.*, 2006; Brunet *et al.*, 2007; Alonso-Díaz *et al.*, 2008). En el ciclo biológico parasitario de los NGI, el primer paso que debe realizar una L₃ para parasitar al hospedero es eliminar la vaina en los compartimientos gástricos después de ser ingerida (Hertzberg *et al.*, 2002). Cuando se inhibe o retrasa el proceso de desenvaine las L₃ son expulsadas del hospedero y mueren. Es posible que el efecto AH de los extractos utilizados se deba a la gran propiedad de los taninos o compuestos polifenólicos para unirse con las proteínas (Makkar, 2003). El proceso del desenvaine ocurre por la acción de proteasas las cuales pueden ser un posible mecanismo donde actúen los

taninos para inhibir el mismo. Se sugiere realizar estudios para corroborar esta hipótesis.

El segundo objetivo fue determinar el efecto AH de los cinco extractos sobre la inhibición de la migración larvaria. El bioensayo de la IML se basa en la habilidad que poseen diferentes sustancias para paralizar las larvas infectantes e inhibir su paso por filtros de mayas de nylon de 20 μm (Rabel *et al.*, 1994). En este estudio, se observó que el extracto de *Cratylia a.* CIAT 22386 tuvo un efecto dosis dependiente sobre la IML de *H. contortus* ($P < 0.01$). Además, los extractos de *Gliricidia sepium* y *Cratylia a.* Veranera inhibieron la motilidad larvaria a la dosis más elevada (1200 μg de extracto/ml de PBS) ($P < 0.05$). Estos resultados son similares a lo reportado por varios autores quienes utilizaron extractos de plantas ricas en compuestos polifenólicos en el trópico (Kahiya *et al.*, 2003; Ademola *et al.*, 2005; Rojas *et al.*, 2006; Cenci *et al.*, 2007; Minho *et al.*, 2007; Alonso-Díaz *et al.*, 2008) o plantas ricas en taninos de clima templado (Barrau *et al.*, 2005; Bahaud *et al.*, 2006; Brunet y Hoste, 2006; Brunet *et al.*, 2007). Hasta el momento, se desconoce el mecanismo de acción de los taninos sobre la IML de los NGI pero se ha corroborado su participación por medio de inhibidores específicos como el PEG y/o el PVPP.

El tercer objetivo de este estudio fue evaluar la participación de los taninos o de compuestos polifenólicos sobre el efecto AH de los cinco extractos, mediante el uso de un inhibidor de los mismos. Los inhibidores específicos de taninos como PEG y/o PVPP han sido utilizados para evaluar la actividad biológica de los taninos en plantas tropicales (Makkar *et al.*, 1995; Barrau *et al.*, 2005; Alonso-Díaz

et al., 2008; Fernández-Salas *et al.*, 2011). El PEG y el PVPP tienen la capacidad de precipitar e inactivar taninos y/o compuestos polifenólicos y de hecho se utilizan en diversas pruebas diagnósticas. En este estudio se observó que la adición del PEG a los extractos bloqueó el efecto AH de los taninos/compuestos polifenólicos tanto en la inhibición del desenvaine como en la IML. También se determinó que los extractos utilizados tuvieron niveles bajos de taninos y niveles considerables de compuestos polifenólicos, por lo que el efecto AH observado en ambos bioensayos puede ser atribuido a los FT.

La actividad biológica de las leguminosas tropicales no se debe específicamente a los taninos, sino también la presencia de otros compuestos como flavonoides y polifenoles, de los cuales se ha registrado que pueden afectar la biología de los parásitos (Athanasiadou *et al.*, 2003; Molan *et al.*, 2003). Makkar (2003) menciona que para evaluar la relación biológica de los compuestos polifenólicos en plantas tropicales, es necesario realizar una batería de pruebas diagnósticas, y reporta que los fenoles totales están más relacionados con la actividad biológica de las plantas tropicales. Esto ha sido corroborado recientemente por Alonso-Díaz *et al.* (2010 b) quienes han evaluado la actividad biológica medida mediante diversas pruebas, como la producción de gas *in vitro* con y sin PEG, así como de precipitación de proteínas y otras pruebas parasitológicas. Shofield (2001) menciona que, a unidad por unidad, los taninos hidrolizables (generalmente no determinados) tienen mayor actividad biológica, en comparación a los taninos condensados. Por lo anterior, se sugiere evaluar el contenido de los compuestos polifenólicos de estos extractos, mediante pruebas

como resonancia magnética o HPLC, para determinar la estructura química que está relacionada con el efecto AH.

9. CONCLUSIÓN.

Se concluye que el tratamiento con los cinco extractos de leguminosas al que fueron sometidas las larvas L₃ de *H. contortus*, inhibieron totalmente el proceso de desenvaine, y parcialmente, la motilidad. Por lo tanto, éstas leguminosas forrajeras podrían ser una buena alternativa para formar parte de un Control Integrado contra las infecciones por NGI en las regiones del trópico, después de evaluar su eficacia en campo.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Köler P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *Int J Parasitol.* 2001;3:336-345.
2. Dimander S, Höglund J, Waller PJ. Seasonal translation of infective larvae of gastrointestinal nematodes of cattle and the effect of *Duddingtonia flagrans*: a 3-year plot study. *Vet Parasitol.* 2003;117:99-116.
3. Nari A, Salles J, Gil A, Waller PJ, Hansen JW. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Uruguay. *Vet Parasitol.* 1996;62:213-222
4. Waller P, Dask K, Barger I, Le Jambre L, Plant J. Anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep: learning from Australian experience. *Vet record.* 1995;22:411-413.
5. Sangster NC. Anthelmintic resistance: past, present and future. *Int J Parasitol.* 1999;29:115-124.
6. Campos RR, Herrera RD, Quiroz RH, Olazaran JS. Resistencia de *Haemonchus contortus* a los bencimidazoles en ovinos de México. *Téc Pec Méx.* 1990;28:30–34.
7. Campos R, Herrera RD, Quiroz RH. Diagnóstico in vitro de *Haemonchus contortus* resistente al albendazol, fenbendazol y febantel en tres rebaños ovinos Tabasco o Pelibuey. *Vet Méx.* 1992;23:51–56.

8. Torres-Acosta JFJ, Dzul-Canche U, Aguilar-Caballero AJ, Rodríguez-Vivas RI. Prevalence of benzimidazole resistant nematodes in sheep flocks in Yucatan, Mexico. *Vet Parasitol.* 2003;114:33–42.
9. Encalada Mena LA, López Arellano Ma E, Mendoza de Gives P, Liébano Hernández E, Vázquez Prats V, Vera Ycuspinera G. Primer informe en México sobre la presencia de resistencia a ivermectina en bovinos infectados naturalmente con nematodos gastrointestinales. *Vet Méx.* 2008;4:39.
10. Guzmán M, Fiel C, Steffan P. La infección cruzada de *Haemonchus contortus* de ovinos a bovinos y el riesgo de transmisión de resistencia antihelmíntica. Una revisión. *Vet Arg.* 2010; 27:272.
11. Nisar Khan M, Iqbal Z, Sohail Sajid M. An account of the botanical anthelmintics used in traditional veterinary practices in Sahiwal district of Punjab, Pakistan Altaf Hussain. *J Ethnopharmacol.* 2008;119:185–190.
12. Makkar H.P. Quantification of tannins in tree and shrub foliage. In: *A laboratory Manual Food and Agriculture Organization of the United Nations/International Atomic Energy Agency (FAO/IAEA).* Vienna Austria. 2003;49-53.
13. Alonso-Díaz MA, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Hoste H. Tannins in tropical tree fodders fed to small ruminants: A friendly foe? *Small Rumin Res.* 2010;89:164-173.
14. McLeod R S. Costs of Major Parasites to the Australian Livestock Industries. *I J Parasit.* 1995;25(11):1363-1367.

15. Charlier J, Höglund J, von Samson-Himmelstjerna G, Dorny P, Vercruyse J. Gastrointestinal nematode infections in adult dairy cattle: Impact on production, diagnosis and control. *Vet Parasitol.* 2009;164:70–79.
16. Entrocasso C.M. Epidemiology and control of bovine ostertagiasis in South America. *Vet Parasitol.* 1988;27:59-65.
17. Fiel C, Anziani O, Suárez V, Vázquez R, Eddi C, Romero J, Caracostantogolo J, Saumell C, Mejía M, Costa J, Steffan P. Resistencia antihelmíntica en bovinos: causas, diagnóstico y profilaxis. *Vet Arg.* 1991;171: 21-33
18. Garriz CA, Touraille CC, Steffan PE, Fiel CA, Biondani CA, Zamorano M, Bulman GM. Gastrointestinal parasitism: its effects on muscle, fat, and bone composition of the carcass and organoleptic characteristics of meat. *MSD AGVET.* 1987:59-68.
19. Paolini V, Prevot F, Dorchies Ph, Hoste H. Lack of effects of quebracho and sainfoin hay on incoming third-stage larvae of *Haemonchus contortus* in goats. *Vet J.* 2005;170:260–263
20. Vatta AF, Lindberg ALE. Managing anthelmintic resistance in small ruminant livestock of resource poor farmers in South Africa. *J S Afr Vet Assoc.* 2006;77:2–8.
21. Wanyangu SW, Karimi S, Mugambi JM, Bain RK. Availability of *Haemonchus contortus* L3 larvae on pasture at Kiboko: a semi-arid warm agro-climatic zone in Kenya. *Acta Tropica.* 1997;68:183–189.
22. Soulsby E.J.L. Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals, 7th ed. London Bailliere Tindall. 1982.

23. Clark CH, Kiessel G, Goby HC. Measurements of blood loss caused by *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Anim J Vet Res.* 1962;23:977-980.
24. Steffan P, Sanchez E, Entrocasso C, Fiel C, Lloberás M, Riva E, Guzmán M. Eficacia de Monepantel contra nematodos de ovinos con resistencia antihelmíntica múltiple en la región templada de Argentina. *Vet Arg.* 2011;28:273.
25. Jackson F, Miller J. Alternative approaches to control-Quo vadit? *Vet Parasitol.* 2006;139:371-384.
26. Torres Vásquez P, Prada Sanmiguel GA, Márquez Lara D. Resistencia antihelmíntica en los nematodos gastrointestinales del bovino. *Rev Med Vet.* 2007;013:59-76.
27. Stafford KA, Coles GC. Nematode control practices and anthelmintic resistance in diary calves in the South West of England. *Vet Rec.* 1999;144:659-661.
28. Suárez VH, Silvina LC. Resistencia antihelmíntica en nematodos bovinos. *Boletín de Divulgación.* 2005;88:98-101.
29. Pomoroy WE. Anthelmintic resistance in New Zeland: a perspective on recent findings and options for the future. *N Z Vet J.* 2006;54:256-270.
30. Soutello RG, Seno MC, Amarante AF. New concepts in strongyle control and anthelmintic resistance: the role of refugia. *Vet J.* 2007;174:6-7.
31. Suarez VH, Cristel SL. Anthelmintic resistance in cattle nematodes in the Western Pampeana region of Argentina. *Vet Parasitol.* 2007;144:111-117.

32. Rochfort S, Parker AJ, Dunshea FR. Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry*. 2008;69:299-322.
33. Torres-Acosta JFJ, Hoste H. Alternative or improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing sheep and goats. *S Rum Res*. 2008;77:159–173.
34. Barger IA. Prospects for integration of novel parasite control options into grazing systems. *Int J Parasitol*. 1996;26:1001-1007.
35. Grønvold J, Henriksen SA, Larssen M, Nansen P, Wolstrup J. Biological control: aspects of biological control-with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. *Vet Parasitol*. 1996;64:47-64.
36. Grønvold J., Wolstrup J., Nansen P., Henriksen S.A. Nematode-trapping Fungi Against Parasitic Cattle Nematodes. *Parasitology Today* 1993;9(4):137-140.
37. Fernández A.S., Larsen M., Nansen P., Grønvold J., Henriksen S.A., Wolstrup J. Effect of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* on the free-living stages of horse parasitic nematodes: a plot study. *Vet. Parasitol* 1997;73:257-266.
38. Chandrawathani P., Jamnah O., Waller P.J., Höglund J., Larsen M., Zahari W.M. Nematophagous fungi as a biological control agent for nematode

- parasites of small ruminants in Malaysia: a special emphasis on *Duddingtonia flagrans*. Vet. Res. 2002;33:685–696.
39. Mendoza-de Gives P., Zapata Nieto C., Liébano Hernández E., López Arellano Ma. E., Herrera Rodriguz D., Gonzalez Garduño R. Biological Control of Gastrointestinal Parasitic Nematodes Using *Duddingtonia flagrans* in Sheep under Natural Conditions in Mexico. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2006;108:355–359.
 40. Arroyo Balán F.L., Mendoza de Gives P., López Arellano Ma. E., Liébano Hernandez E., Vázquez Prats V., Miranda Miranda E., Ortiz de M.N. A.Ma. Evaluación de un método combinado de control de la hemoncosis ovina en condiciones controladas. Tecnica pecuaria en Mex. 2008;46:217-223.
 41. Brunet S., Jackson F., Hoste H. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. Int. J. Parasitol 2008;38:783–790.
 42. Casillas Aguilar J.A., Mendoza de Gives P., López-Arellano Ma.E., Liébano Hernández E. Evaluation of Multinutritional Pellets Containing *Duddingtonia flagrans* Chlamyospore for the Control of Ovine Haemonchosis. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2008;1149:161–163.
 43. Ojeda-Robertos N.F., Torres-Acosta J.F.J., Aguilar-Caballero A.J., Ayala-Burgos A., Cob-Galera L.A., Sandoval-Castro C.A., Barrientos-Medina R.C., Mendoza de Gives P. Assessing the efficacy of *Duddingtonia flagrans* chlamydo spores per gram of faeces to control *Haemonchus contortus* larvae. Vet. Parasitol. 2008;158:329–335.

44. Galindo-Barboza A.J., Torres-Acosta J.F.J., Cámara-Sarmiento R., Sandoval-Castro C.A., Aguilar-Caballero A.J., Ojeda-Robertos N.F., Reyes-Ramírez R., España-España E. Persistence of the efficacy of copper oxide wire particles against *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet. Parasitol* 2010. ARTICLE IN PRESS.
45. Nordbring-Hertz B., Friman E., Mattiasson B. A recognition mechanism in the adhesion of nematodes to nematode-trapping fungi. *Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry* 1982;11:83-90.
46. Jackson F. Nutrition and immunity of nematodes of livestock. *Parasite Immunology* 2008;30:61-62.
47. Houdijk J.G.M., Kyriazakis I., Jackson F., Huntley J.F., Coop R.L. Effects of protein supply and reproductive status on local and systemic immune responses to *Teladorsagia circumcincta* in sheep. *Vet. Parasitol* 2005;129:105–117.
48. Houdijk J.G.M., Jackson F., Coop R.L., Kyriazakis I. Rapid improvement of immunity to *Teladorsagia circumcincta* is achieved through a reduction in the demand for protein in lactating ewes. *Int J Parasitol*. 2006;36:219–227.
49. Sandberg F.B., Emmans G.C., Kyriazakis I. The effects of pathogen challenges on the performance of naïve and immune animals: the problems of prediction. *Animal* 2007;1:67-86.
50. Hoste H., Gaillard L., Le Frileux Y. Consequences of the regular distribution of sainfoin hay on gastrointestinal parasitism with nematodes and milk production in dairy goats. *S Rum. Res.* 2005;59:265–271.

51. Ketzis J.K., Vercruyse J., Stromberg B.E., Larsen M., Athanasiadou S., Houdijk J.G.M.. Evaluation of efficacy expectations for novel and non-chemical helminth control strategies in ruminants. *Vet. Parasitol* 2006;139:321–335.
52. Jackson F., Bartley D., Bartley Y., Kenyon F. Worm control in sheep in the future. *S Rum Res* 2009;86:40–45.
53. Knox, D.P. Development of vaccines against gastrointestinal nematodes. *Parasitology* 2000;120:S43–S61.
54. LeJambre L.F., Windon R.G., Smith W.D. Vaccination against *Haemonchus contortus*: Performance of native parasite gut membrane glycoproteins in Merino lambs grazing contaminated pasture. *Vet. Parasitol* 2008;153:302–312.
55. Schallig H.D.F.H., van Leeuwen M.A.W., Cornelissen W.C.A. Protective immunity induced by vaccination with two *Haemonchus contortus* excretory secretory proteins in sheep. *Parasite Immunol* 1997;19:447-453.
56. Mirkena T., Duguma G., Haile A., Tibbo M., Okeyo A.M., Wurzinger M., Sölkner J. Genetics of adaptation in domestic farm animals: A review. *Livestock Sci* 2010;132:1–12.
57. Beh J.K., Maddox J.F. Prospects for Development of Genetic Markers for Resistance to Gastrointestinal Parasite Infection in Sheep. *Int J Parasitol* 1996;26(8/9):879-897.
58. Knox D.P., Redmond D.L., Skuce P.J., Newlands G.F.J. The contribution of molecular biology to the development of vaccines against nematode and

- trematode parasites of domestic ruminants. *Vet Parasitol* 2001;101:311–335.
59. Bisset S.A., Morris C.A., McEwan J.C., Vlassoff A. Breeding sheep in New Zealand that are less reliant on anthelmintics to maintain health and productivity. *N. Z. Vet. J.* 2001;49:236–246.
 60. Burke J.M., Miller J.E., Olcott D.D., Olcott B.M., Terrill T.H. Effect of copper oxide wire particles dosage and feed supplement level on *Haemonchus contortus* infection in lambs. *Vet Parasitol* 2004;123:235–243.
 61. Knox MR. Effectiveness of copper oxide wire particles for *Haemonchus contortus* control in sheep. *Aust Vet J* 2002,80(4):224-227.
 62. Githiori J.B., Athanasiadou S., Thamsborg S.M. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Vet Parasitol* 2006;139:308–320.
 63. Barrau E., Fabre N., Fouraste I., Hoste H. Effect of bioactive compounds from sainfoin (*Onobrychis viciifolia scop.*) on the in vitro larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. *Parasitology* 2005;13:531–538.
 64. Athanasiadou S., Githiori J., Kyriazakis I. Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction. *Animal* 2007;1:1392-1400.
 65. Lascano. C.E., Avila P. Potencial de producción de leche en pasturas solas y asociadas con leguminosas adaptadas a suelos ácidos. *Pasturas tropicales* 1991;13(3):2-10.

66. Waghorn G. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production—Progress and challenges. *A F Sci Technol* 2008;147:116-139.
67. Schofield P., Mbugua D.M., Pell A.N. Analysis of condensed tannins: a review. *A F Sci Technol* 2001;91:21-40.
68. Mueller-Harvey I. Analysis of hydrolysable tannins. *A F Sci Technol* 2001;91:3-20.
69. McSweeney C.S., Palmer B., McNeill D.M., Krause D.O. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Anim F Sci Technol* 2001;91:83-93.
70. Paolini V., Fouraste I., Hoste H. In vitro effects of three woody plant and sainfoin extracts on 3rd-stage larvae and adult worms of three gastrointestinal nematodes. *Parasitology* 2004;129:69–77.
71. Min B.R., Barry T.N., Attwood G.T., McNabb W.C. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Anim F Sci Technol* 2003;106:3-19.
72. Akiyama H., Fujii K., Yamasaki O., Oono T., Iwatsuki K. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2001;48:487-491.
73. Banso A., Adeyemo S.O. Evaluation of antibacterial properties of tannins isolated from *Dichrostachys cinerea*. *Afr J Biotechnol* 2007;15:1785-1787.
74. Amarowicz R., Naczek M., Shahini F. Antioxidant activity of crude tannins of canola and rapeseed hulls. *J Amer Oil Chem Soc* 2000;77:957-961.

75. Smirnova G.V., Vysochina G.I., Muzyka N.G., Samoilova Z., Kukushkina T.A., Oktabr'skii O.N. The Antioxidant Characteristics of Medicinal Plant Extracts from Western Siberia. *Appl Biochem Microbiol* 2009;45: 638 - 641.
76. Hoste H., Jackson F., Athanasiadou S., Thamsborg S.M., Hoskin S.O. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol* 2006;22:253-261.
77. Alonso-Díaz M.A., Torres-Acosta J.F.J., Sandoval-Castro C.A., Capetillo-Leal C., Brunet S., Hoste H. Effects of four tropical tanniferous plant extracts on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. *Vet Parasitol* 2008;153:187-192.
78. Feeny P. Seasonal Changes in Oak Leaf Tannins and Nutrients as a Cause of Spring Feeding by Winter Moth Caterpillars. *Ecology* 1970;51:565-581.
79. Ayres M.P., Clausen T.P., MacLean S.F., Redman A.M., Reichardt P.B. Diversity of structure and anti-herbivore activity in condensed tannins. *Ecology* 1997;78:1696-1712.
80. Barbehenn R.V., Jaros A., Lee G., Mozola C., Weir Q., Salminen J.P. Hydrolyzable tannins as "quantitative defenses": Limited impact against *Lymantria dispar* caterpillars on hybrid poplar. *Vet Parasitol* 2009;55:297-304.
81. Hoskin S.O., Barry T.N., Wilson P.R., Charleston W.A.G., Hodgson J. Effects of reducing anthelmintic input upon growth and faecal egg and larval counts in young farmed deer grazing chicory (*Cichorium intybus*) and

- perennial ryegrass (*Lolium perenne*)/ white clover (*Trifolium repens*) pasture. J. Agric. Sci. Camb. 1999;132:335–345.
82. Niezen J.H., Waghorn T.S., Charleston W.A.G., Waghorn G.C. Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either lucerne (*Medicago sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. J. Agric. Sci. 1995;125:281–289.
83. Tzamaloukas O., Athanasiadou S., Kyriazakis I., Jackson F., Coop R.L. The consequences of short-term grazing of bioactive forages on established adult and incoming larvae populations of *Teladorsagia circumcincta* in lambs. Int. J. Parasitol. 2005;35:329–335.
84. Heckendorn F., Haring D.A., Maurer V., Zinsstag J., Langhans W., Hertzberg H. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) silage and hay on established populations of *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei* in lambs. Vet. Parasitol. 2006;142: 293–300.
85. Niezen J.H., Robertson H.A., Waghorn G.C. Production, faecal egg counts and worm burdens of ewe lambs which grazed six contrasting forages. Vet. Parasitol. 1998;80:15–27.
86. Marley C.L., Cook R., Keatinge R., Barret J., Lampkin NH. The effect of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and chicory (*Cichorium intybus*) on parasite intensities and performance of lambs naturally infected with helminth parasites. Vet. Parasitol. 2003;112:147–155.
87. Min B.R., Pomroy W.E., Hart S.P., Sahlou T. The effect of short-term consumption of a forage containing condensed tannins on gastro-intestinal

- nematode parasite infections in grazing wether goats. *Small Rum Res* 2004;51:279–283.
88. Min B.R., Hart S.P, Miller D., Tomita G.M., Loetz E., Sahlu T. The effect of grazing forage containing condensed tannins on gastro-intestinal parasite infection and milk composition in Angora does. *Vet. Parasitol.* 2005;130:105–113.
89. Lange K.C., Olcott D.D., Miller J.E., Mosjidis J.A., Terrill T.H., Burke J.M., Kearney M.T. Effect of *Sericea lespedeza* (*Lespedeza cuneata*) fed as hay, on natural and experimental *Haemonchus contortus* infections in lamb. *Vet. Parasitol.* 2006;141: 273–278.
90. Shaik S.A., Terrill T.H., Miller J.E., Kouakou B., Kannan G., Kaplan R.M., Burke J.M., Mosjidis J.A. *Sericea lespedeza* hay as a natural deworming agent against gastrointestinal nematode infections in goats. *Vet. Parasitol.* 2006;139: 150–157.
91. Joshi B.R., Kommurub D.S., Terrill T.H., Mosjidisc J.A., Burked J.M., Shakyae K.P., Miller J.E. Effect of feeding *Sericea lespedeza* leaf meal in goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol* 2010; ARTICLE IN PRESS.
92. Alonso-Díaz M.A., Torres-Acosta J.F.J., Sandoval-Castro C.A., Aguilar-Caballero A.J., Hoste H. In vitro larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniferous plant extracts. *Vet Parasitol* 2008 (b);153:313-319.

93. Ademola I.O., Akanbi A.I., Idowu S.O. Comparative nematocidal activity of chromatographic fractions of *Leucaena leucocephala* seed against gastrointestinal sheep nematodes. *Pharm. Biol.* 2005;43:599–604.
94. Rojas D.K., Lóopez J., Tejada I., Vázquez V., Shimada A., Sánchez D., Ibarra F. Impact of condensed tannins from tropical forages on *Haemonchus contortus* burdens in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) and Pelibuey lambs. *Anim F Sci Technol* 2006;28:218–228.
95. Cenci F.B., Louvandini H., McManus C.M., Dell’Porto A., Costa D.M., Araújo S.C., Minho A.P., Abdalla A.L. Effects of condensed tannin from *Acacia mearnsii* on sheep infected naturally with gastrointestinal helminths. *Vet. Parasitol.* 2007;144:132–137.
96. Minho A.P., Bueno I.C.S., Louvandini H., Jackson F., Gennari S.M., Abdalla A.L. Effect of *Acacia molissima* tannin extract on the control of gastrointestinal parasites in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2007;147:172–181.
97. Kahiya C., Mukaratirwa S., Thamsborg S.M. Effects of *Acacia nilotica* and *Acacia karoo* diets on *Haemonchus contortus* infection in goats. *Vet. Parasitol.* 2003;115:265–274.
98. Chagas A.C.S., Vieira L.S., Freitas A.R., Araújo M.R.A., Araújo-Filho J.A., Araguao W.R., Navarro A.M.C. Antihelmintic efficacy of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) and the homeopathic product Fator Vermes® in Morada Nova sheep. *Vet Parasitol* 2008;151:68-73.
99. Coop R.L. and Kyriazakis I. Nutrition–parasite interaction. *Vet. Parasitol.* 1999;84:187–204.

100. Athanasiadou S., Kyriazakis I., Jackson F., Coop R.L. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. *Vet. Parasitol* 2001;99:205–219.
101. Paolini V., Frayssines A., De la Farge F., Dorchies P., Hoste H.. Effects of condensed tannins on established populations and on incoming larvae of *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta* in goats. *Vet. Res* 2003;34:331–339.
102. Nguyen T.M., Van Binh D., Ørskov E.R. Effect of foliages containing condensed tannins and on gastrointestinal parasites. *Anim F Sci Tech* 2005;121:77–87
103. Rabel B., Mcgregor R., Douch P.G.C. Improved bioassay for estimation of inhibitory effects of ovine gastrointestinal mucus and anthelmintics on nematode larval migration. *Int. J. Parasitol.* 1994;24:671–676.
104. STATGRAPHICS plus v. 5.1. 1994-2000 Statistical Graphics Corp.
105. Molan A.L., Warghorn G.C., McNabb W.C. Effect of condensed tannins on egg hatching and larval development of *Trichostrongylus colubriformis* in vitro. *Vet. Rec.* 2002;150:65–69.
106. Bahuaud D., Martinez-Ortiz de Montellano C., Chaveau S., Prevot F., Torres-Acosta F., Fouraste I., Hoste H. Effects of four tanniferous plant extracts on the in vitro exsheathment of thirdstage larvae of parasitic nematodes. *Parasitology* 2006;132:545–554.
107. Brunet S., Aufrere J., El Babili F., Fouraste I., Hoste H. The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in the presence of a

- tannin-rich plant extract (sainfoin) both in vitro and in vivo. *Parasitology* 2007;134:1253–1262.
108. Hertzberg H., Huwyler U., Kohler L., Rehbein S., Wanner M. Kinetics of exsheathment of infective ovine and bovine strongylid larvae in vivo and in vitro. *Parasitology* 2002;125:65–70.
109. Brunet S., Hoste H. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *J. Agric. Food Chem.* 2006;54:7481–7487.
110. Makkar H.P., Blümmel M., Becker K. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in in vitro techniques. *Br. J. Nutr.* 1995;73:897–913.
111. Fernández-Salas A., Alonso-Díaz M.A., Acosta-Rodríguez R., Torres-Acosta J.F.J., Sandoval-Castro C.A., Rodríguez-Vivas R.I. In vitro acaricidal effect of tannin-rich plants against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) . *Vet Parasitol* 2010;ARTICLE IN PRESS.
112. Athanasiadou S., Kyriazakis I. and Jackson F. Can plant secondary metabolites have a role in controlling gastrointestinal nematode parasitism in small ruminants? Proceedings of the satellite symposium: secondary compounds and browse utilization. The VI International Symposium on the Nutrition of Herbivores. Satellite Symposium 19th- 24th October 2003. Merida, Mexico. 16-25.

113. Molan A.L, Meagher L.P., Spencer P.A., Sivakumaran S. Effect of flavan- 3-ol on in vitro egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. *Int J Parasitol* 2003;33:1691-1698.
114. Alonso-Díaz M.A., Torres Acosta J.F.J., Sandoval Castro C.A., Capetillo-Leal C.M. Polyphenolic compounds of nutraceutical trees and the variability of their biological activity measured by two methods. *Trop S Agroeco*. 2010 (b);12:649-656.