

Efecto antihelmíntico de *Dichrostachys cinerea* sobre larvas infectantes (L₃) de ciatostomas resistentes a Albendazol

Lester A. Aguilera-Valle, Anay Delgado-Martínez y Josmel Salas-Romero

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Camagüey, Cuba

lester.aguilera@reduc.edu.cu

RESUMEN

Se evaluó el efecto antihelmíntico *in vitro* de los extractos acuosos crudos de las hojas y corteza de *Dichrostachys cinerea* sobre larvas infectantes (L₃) de ciatostomas resistentes al Albendazol. Primeramente se realizó el ensayo de inhibición del desvaine larval. Las larvas del tercer estadio (L₃) fueron expuestas durante tres horas a los extractos acuosos crudos de las hojas (4 mg/ml) y corteza (6,8 mg/ml) de *Dichrostachys cinerea*, y luego sometidas al proceso de desvaine artificial con observaciones del proceso cada 10 min. Se utilizó un T-student pareado para determinar la diferencia de los por cientos de larvas desvainadas entre el control y los grupos de tratamiento. El programa estadístico empleado fue GraphPadPrism 5.0.0. Todos los extractos inhibieron significativamente ($P < 0,05$) el proceso de desvainado. Mientras en el control el desvaine fue del 100 %, con el extracto de las hojas y la corteza de *D. cinerea* fue del 24,05 y el 12,56 %, respectivamente. Los resultados sugieren el uso de *D. cinerea* como alternativa en tratamientos antihelmínticos sobre poblaciones de ciatostomas resistentes a Albendazol.

Palabras clave: nematodos, parásitos, ciatostomas, desvaine, larvas del tercer estadio

Anthelmintic Effect of *Dichrostachys cinerea* on Infectious L₃ larvae of Cyasthoms Resistant to Albendazol

ABSTRACT

In vitro anthelmintic effect of raw aqueous extracts from leaves and bark of *Dichrostachys cinerea* on infectious L₃ larvae of Cyasthoms resistant to Albendazol, was evaluated. An inhibition assay for larval hatching was made. Third-stage larvae (L₃) were exposed to raw aqueous extracts from leaves (4 mg/ml), and bark (6.8 mg/ml) of *Dichrostachys cinerea*, for three hours, and hatching was induced, with observations every 10 min. Paired T-Student was used to determine the percent difference of hatched larvae between the control and the treatment groups. GraphPad-Prism 5.0.0 was used in the study. Significant inhibition levels were observed in all the extracts ($P < 0.05$) during the process; whereas hatching in the control group was 100 %, the leaf and bark extracts of *D. cinerea* were 24.05, and 12.56 %, respectively. The results suggest the use of *D. cinerea* as an alternative anthelmintic treatment to Albendazol-resistant Cyasthomo populations.

Key words: parasitic nematodes, Cyasthoms, hatching, third-stage larvae

INTRODUCCIÓN

En todo el mundo los caballos están expuestos a una serie de parásitos; de ellos los más prevalentes pertenecen al grupo de los ciatostomas (Kuz'mina, 2012; Relf *et al.*, 2013). Cuando la carga parasitaria de ciatostomas es alta pueden comprometer seriamente la salud del animal (Mair, 1994; Matthews, 2008 y Matthews, 2014). Cargas sustanciales (varios millones) de ciatostomas inmaduros pueden enquistarse en la pared del intestino grueso y persistir por años (Murphy y Love, 1997). Estos estadios, particularmente el estadio temprano de L₃, son insensibles a la mayoría de los antihelmínticos disponibles (Monahan *et al.*, 1996).

Desde 1960 el control de los nematodos se ha basado en la administración frecuente de antihelmínticos sintéticos (Parry *et al.*, 1993; Kaplan

y Nielsen, 2010) que han sido efectivos al reducir sustancialmente la prevalencia de infecciones por estrongilos, pero que, al mismo tiempo, han contribuido al desarrollo de resistencia antihelmíntica, particularmente en las especies de ciatostomas (Kaplan, 2004).

La necesidad de encontrar alternativas para el control de los nematodos que puedan reducir el uso de antihelmínticos es reconocida internacionalmente; entre tales alternativas se destaca el uso de plantas con propiedades antihelmínticas (Molento *et al.*, 2011). La actividad antihelmíntica puede deberse a la presencia de diferentes metabolitos secundarios (Athanasiadou y Kyriazakis, 2004) como glucósidos cianogénicos, esteroides, taninos (Alonso-Díaz *et al.*, 2008), alcaloides, aminoácidos no proteicos (Githiori *et al.*, 2006) o

terpenoides y saponinas (Marie-Magdeleine *et al.*, 2009).

Los test *in vitro* pueden usarse como un paso preliminar para evaluar los posibles efectos antihelmínticos de los extractos de plantas (Costa *et al.*, 2002). Varios métodos son usados comúnmente para examinar la actividad antihelmíntica, tanto de drogas como de plantas. Entre ellos los ensayos *in vitro* han mostrado ser relevantes y más baratos que los *in vivo*. Actualmente el test de inhibición del desenvaine larval (Bahuaud *et al.*, 2006) se utiliza para estos fines (Alonso-Díaz, Torres-Acosta, Sandoval-Castro y Hoste, 2011).

Dichrostachys cinerea (marabú) es un arbusto o árbol pequeño que alcanza por lo común alturas máximas de 4 a 5 m, muy abundante en el territorio cubano y, particularmente, en la provincia de Camagüey, donde sus frutos y corteza se utilizan como antisépticos dado que toda la planta es rica en taninos (Roig, 1974) y popularmente los campesinos la utilizan como antihelmíntico. También es usada su corteza para tratar la elefantiasis, sífilis, gonorrea, lepra y como vermífugo en Sierra Leona (Dalziel, 1948). El objetivo del presente trabajo consiste en evaluar el efecto antihelmíntico *in vitro* de los extractos acuosos de *Dichrostachys cinerea* sobre larvas infectantes (L₃) de ciatostomas resistentes al Albendazol mediante el ensayo de inhibición del desenvaine larval.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de los extractos

Todas las partes de las plantas usadas para el experimento fueron colectadas en la Universidad de Camagüey. Para la preparación del extracto acuoso crudo de las hojas de *D. cinerea* fueron usados 4 g de hojas frescas, se maceraron en un mortero y a continuación se mezclaron con 20 ml de agua destilada en un matraz donde se dejaron reposar por 12 h. Posteriormente se filtró haciendo tamizajes sucesivos en filtros de 50 y 25 µm y, finalmente, en un filtro Whatman de 0,45 µm. El filtrado obtenido fue el utilizado para los experimentos y la concentración calculada a partir de la desecación en la estufa de 100 µl, previamente pesados. Para la preparación del extracto acuoso crudo de la corteza se utilizaron 8 g de la corteza del tronco de *Dichrostachys cinerea*, se mezcló con 30 ml de agua y fue sometidos al mismo procedimiento.

Larvas infectantes

Las larvas (L₃) fueron obtenidas por coprocultivo a partir de heces de equinos previamente diagnosticados con nematodos resistentes a Albendazol mediante el test de reducción del conteo de huevos en las heces.

Ensayo de inhibición del desenvaine larval

El ensayo de inhibición del desenvaine larval se desarrolló según Aguilera y Delgado (2015).

Análisis estadístico

Se utilizó un T student pareado para determinar la diferencia de los por cientos de larvas desenvainadas entre el control y los grupos de tratamiento. El programa estadístico empleado fue GraphPadPrism 5.0.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Fig. 1 se aprecia el por ciento total de desenvaine de L₃ del grupo control y los grupos tratados con posterioridad al contacto con una solución de hipoclorito de sodio al 0.0066 % durante 60 min. En el grupo control el desenvaine fue del 100 %; sin embargo, el contacto durante 3 h con los extractos acuosos inhibió significativamente ($P < 0,05$) el proceso de desenvaine. Después de 60 min sólo el 24,05 % y el 12,56 % de las larvas habían desenvainado para *D. cinerea* (hojas) y *D. cinerea* (corteza), respectivamente.

La cinética del desenvaine a lo largo de los 60 min se muestra en la Fig. 2. En el grupo control y en los tratamientos con *D. cinerea* (hojas) el desenvaine comenzó a partir de los 20 min y en *D. cinerea* (corteza) a partir de los 30 min.

Este es el primer reporte de la actividad antihelmíntica de los extractos acuosos de *D. cinerea* sobre larvas infectantes del tercer estadio de ciatostomas. Aunque en esta investigación no se cuantificaron los contenidos en taninos de los extractos usados, todas las partes de esta planta poseen, según Roig (1974), un elevado nivel de taninos; por lo que los autores asumen que los efectos antihelmínticos observados se deben a tales compuestos.

El desenvaine de L₃ representa la transición de la fase de vida libre a la fase parasitaria, y es esencial en el ciclo de vida de los nematodos. Se ha reportado que los taninos interrumpen el proceso de desenvaine, evitando de esta forma el establecimiento de la larva infectiva en el hospedero y la consecuente infección (Brunet *et al.*, 2007). El mecanismo de acción de los taninos sobre L₃ no

se ha determinado, aunque algunos datos apoyan la hipótesis de un efecto directo (Brunet *et al.*, 2008).

El modo de acción de los taninos en el desenvaine larval podría envolver la habilidad de los taninos para unirse con aminoácidos de glicoproteínas presentes en la cutícula o para inactivar enzimas envueltas en este proceso y, por consiguiente, afectar el desenvaine (Hoste *et al.*, 2006; Iqbal *et al.*, 2007).

Este resultado también confirma por primera vez el efecto de los taninos sobre el desenvaine de especies de ciatostomas, información importante, que se debe tener en cuenta al tratar nematodos resistentes a Albendazol.

CONCLUSIONES

Ambos extractos mostraron actividad antihelmíntica, lo cual avala al *D. cinerea* como antiparasitario, aunque son necesarios estudios *in vivo* para confirmar sus propiedades antihelmínticas y evaluar su uso en el manejo sostenible de los nematodos gastrointestinales.

RECOMENDACIONES

Es necesario realizar estudios fitoquímicos que cuantifiquen y correlacionen el contenido en taninos con la actividad antihelmíntica.

REFERENCIAS

AGUILERA-VALLE, L. A. y DELGADO, M. A. (2015). Primer reporte del uso del ensayo de inhibición del desenvaine larval en ciatostomas. Nota Técnica. *Revista de Producción Animal*, 27 (2).

ALONSO-DÍAZ, M. A.; TORRES-ACOSTA, J. F.; SANDOVAL-CASTRO, C. A.; AGUILAR-CABALLERO, A. J. y HOSTE, H. (2008). *In vitro* Larval Migration and Kinetics of Exsheathment of *Haemonchus contortus* Larvae Exposed to Four Tropical Tanniferous Plant Extracts. *Vet. Parasitol.*, 153, 313-319.

ALONSO-DÍAZ, M. A.; TORRES-ACOSTA, J. F.; SANDOVAL-CASTRO, C. A. y HOSTE, H. (2011). Comparing the Sensitivity of Two *In Vitro* Assays to Evaluate the Anthelmintic Activity of Tropical Tannin rich Plant Extracts Against *Haemonchus contortus*, *Veterinary Parasitology*, 181, 360-364.

ATHANASIADOU, S y KYRIAZAKIS, I. (2004). Plant Secondary Metabolites: Antiparasitic Effects and Their Role in Ruminant Production Systems, *P. Nutr. Soc.*, 63, 631-639.

BAHUAUD, D.; MARTÍNEZ-ORTIZ de MONTELLANO, C.; CHAVEAU, S.; PREVOT, F.; TORRES-ACOSTA, F.; FOURASTE, I. *et al.* (2006). Effects of Four Tanniferous Plant Extracts on the *In Vitro* Exsheathment

of Third-Stage Larvae of Parasitic Nematodes. *Parasitology*, 132, 545-554.

BRUNET, S.; AUFRERE, J.; EL BABILI, F.; FOURASTE, I. y HOSTE, H. (2007). 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*, 134, 1253-1262.

BRUNET, S.; MARTÍNEZ-ORTIZ de MONTELLANO, C.; TORRES-ACOSTA, J. F.; SANDOVAL-CASTRO, C. A.; AGUILAR-CABALLERO, A. J.; CAPETILLO-LEAL, C. *et al.* (2008). Effect of the consumption of *Lysiloma latisiliquum* on the larval establishment of parasitic nematodes in goats, *Vet. Parasitol.*, 157, 81-8.

COSTA, C. T.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M.; SOUZA, M. M. y LEITE, F. K. (2002). Efeito ovicida de extratos de sementes de *Mangifera indica* L. sobre *Haemonchus contortus*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 11, 5-60.

DALZIELD, J. M. (1948). *The Useful Plants of West Tropical Africa*. Westminster, Londres: The Crown Agents for the Colonies.

DOMÍNGUEZ, S. X. (1979). *Métodos de investigación fitoquímica*. México, D. F.: Ed. Limusa S. A.

GITHIORI, J. B.; ATHANASIADOU, S. y THAMSBORG, S. M. (2006). Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants, *Vet. Parasitol.*, 139, 308-320.

HOSTE, H.; JACKSON, F.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S.M. y HOSKIN, S.O. (2006). The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol.*, 22, 253-261.

IQBAL, Z.; SARWAR, M.; JABBAR, A.; AHMED, S.; NISA, M.; SAJID, M.S. *et al.* (2007). Direct and Indirect Anthelmintic Effects of Condensed Tannins in Sheep. *Vet. Parasitol.*, 144, 125-131.

KAPLAN, R.M. (2004). Drug Resistance in Nematodes of Veterinary Importance: a Status Report, *Trends Parasitol.*, 20, 477-481.

KAPLAN, R. M. y NIELSEN, M. K. (2010). An Evidence-Based Approach to Equine Parasite Control: it Ain't the 60s Anymore. *Equine Vet. Educ.*, 22, 306-316.

KUZ'MINA, T. A. (2012). Strongylids (Nematoda: Strongylidae) of Domestic Horses in Ukraine: Modern State of Fauna and Structure of the Parasite Community. *Parazitologia*, 46, 127-138.

MAIR, T.S. (1994). Outbreak of Larval Cyathostomiasis Among a Group of Yearling and Two-Year-Old Horses, *Vet. Rec.*, 135, 598-600.

MARIE-MAGDELEINE, C.; HOSTE, H.; MAHIEU, M.;VARO, H. y ARCHIMEDE, H.(2009). *In vitro* Effects of *Cucurbita moschata* seed Extracts on *Haemonchus contortus*, *Vet. Parasitol.*, 161, 99-105.

MATTHEWS, J. B. (2008). An Update on Cyathostomins: Anthelmintic Resistance and Worm Control. *Eq. Vet. Educ.*, 20, 552-560.

MATTHEWS, J. B. (2014). The Future of Helminth Control in Horses. *Equine Vet. J.*, 46, 10-11.

MOLENTO, M.; SILVA, F.; ARAUJO, D.; BORGES, F.; CHAGAS, A.; TORRES-ACOSTA, J. F. *et al.* (2011). Challenges of Nematode Control in Ruminants: Focus on Latin America, *Veterinary Parasitology*, 180, 126-132.

MONAHAN, C. M.; CHAPMAN, M. R.; TAYLOR, H. W.; FRENCH, D. D y KLEI, T. R. (1996). Comparison of Moxidectin Oral Gel and Ivermectin Oral Paste Against a Spectrum of Internal Parasites of Ponies with Special Attention to Encysted Cyathostome Larvae. *Vet. Parasitol.*, 63, 225-235.

MURPHY, D y LOVE, S (1997). The Pathogenic Effects of Experimental Cyathostome Infections in Ponies. *Vet. Parasitol.*, 70, 99-110.

PARRY, J. M.; FISHER, M. A.; GRIMSHAW, W.T. y JACOBS, D.E. (1993). Anthelmintic Dosing Intervals for Horses: Comparison of Three Chemical Groups. *Vet. Rec.*, 133, 346-347.

RELF, V. E.; MORGAN, E. R.; HODGKINSON, J.E. y MATTHEWS, J. B. (2013). Helminth Excretion with Regard to Age, Gender and Management Practices on UK Thoroughbred Studs, *Parasitology*, 140, 641-652.

ROIG MESA, J. T. (1974). *Plantas medicinales, aromáticas y venenosas de Cuba*. La Habana, Cuba: Editorial Ciencia y Técnica.

Recibido: 22-7-2015

Aceptado: 1-9-2015

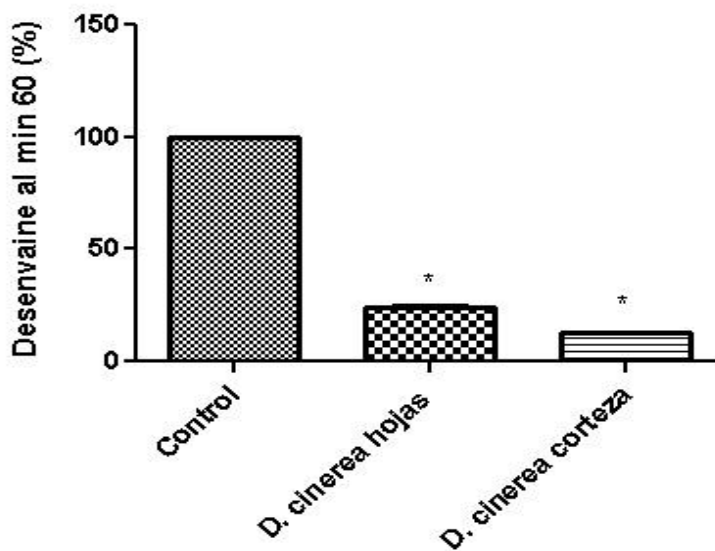


Fig. 1 Efecto de los extractos acuosos crudos de *D. cinerea* sobre el por ciento del desenvaine a los 60 min
* ($P < 0,05$)

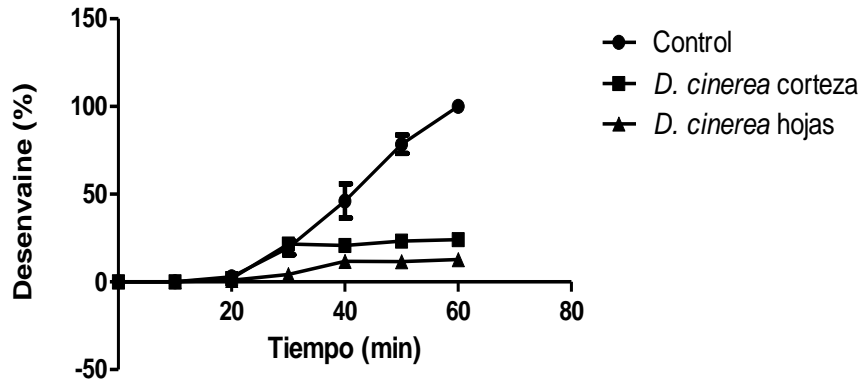


Fig. 2 Efecto de los extractos acuosos crudos de *D. cinerea* sobre la cinética del desvenaine artificial de las larvas infectantes del tercer estadio (L3) de ciatostomas