

CRIBADO ANTIHELMÍNTICO DE PLANTAS RECOLECTADAS EN LA PROVINCIA DE LA PAMPA

Lamberti, R. O¹; Troiani, H. O²; Steibel, P. E²; Toso, R. E²; Boeris, M. A²; Gino, L. M¹; Calvo, C. D¹; Bertorello Mascaró, G¹; Giraudó, M.²; Genero, G²

¹Cátedra de Parasitología; ²Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos (CIDEF), Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam. Calle 5 y 116, 6360. General Pico, La Pampa. parasitologia50@hotmail.com

Resumen

El trabajo consistió en exponer larvas III de *Haemonchus* spp. a distintas concentraciones de extractos hidroalcohólicos obtenidos de plantas nativas y naturalizadas de las provincias de la Pampa con el objeto de determinar su efecto larvicida. Los extractos vegetales fueron provistos por el Banco de Extractos Vegetales del Centro de Investigación y Desarrollo de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de la Pampa (CIDEF). Las larvas de *Haemonchus* spp. fueron cultivadas a partir de materia fecal de ovinos infectados con cepas puras de parásitos y mantenidos en confinamiento para evitar la contaminación. Estas larvas fueron aportadas por la Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLPam. De un total de 53 extractos hidroalcohólicos ensayados, 20 lograron inhibir totalmente la motilidad de las larvas, 18 lo hicieron en forma moderada y 15 no tuvieron efecto sobre la motilidad.

Palabras clave: antihelmínticos, extractos vegetales, antiparasitarios, *Haemonchus* spp

Abstract

Haemonchus spp. larva III were exposed to different concentrations of hydro-alcoholic extract of native and naturalized plant of La Pampa province, with the objective to evaluate the larvicidal effect. The vegetable extracts were provided by the plant extract bank of the research and development centre (CIDEF) of the Faculty of Veterinary Medicine at the National University of La Pampa. The *Haemonchus* spp. was cultured from faeces of infected ovine maintained in confinement to avoid contamination. The larvae were provided by the Parasitology and Parasitic Diseases course at the Faculty of Veterinary Medicine

at the National University of La Pampa. Out of 53 vegetable hydroalcoholic extract proven, 20 inhibit completely the larva motility, 18 have hardly effect and 15 did not have any effect.

Key word: anthelmintic, vegetable extract, parasitic, *Haemonchus* spp

Introducción

El uso de los antiparasitarios desde hace varios años, ha producido, principalmente en el ganado ovino y bovino, la presencia de fenómenos de resistencia antihelmíntica (RA), (Mc Kenna, 1996), determinando una de las amenazas más serias que enfrenta la industria agropecuaria.

La RA es la habilidad de una población de parásitos, para sobrevivir a dosis de antiparasitario, que serían letales para la mayoría de los individuos en una población normal (FAO – OMS). Es decir que la RA se presenta cuando se administra una droga en la dosis y forma correcta a un animal enfermo sin que actúe eficazmente (Nari et al., 2000; Benavides, 2001), aunque deben descartarse problemas relacionados con la administración inadecuada de la droga.

La presencia de RA luego de planes sanitarios que incluyen la aplicación sistemática de un mismo antiparasitario, obligan a cambiar por otros que pertenezcan a un grupo químico diferente. Sin embargo, continuar con esta modalidad puede determinar que a través del tiempo, el espectro de las drogas disponibles en el mercado se encuentre drásticamente reducido.

Entre las medidas propuestas para evitar la RA pueden mencionarse algunas de manejo, tales como rotar diferentes especies en el mismo potrero, períodos de descanso entre pastoreo y pastoreo, destinar en forma intercalada potreros para agricultura con el fin de man-



tener una población de parásitos restringida. Prolongar la vida útil de los antihelmínticos rotando grupos químicos y adoptando las distintas técnicas de manejo, implica una serie de trastornos operativos. Esto puede comprenderse fácilmente si por ejemplo comparamos el uso de las Ivermectinas, con los Bencimidazoles o Imidazotiazoles. También debe mencionarse que es difícil imponer a los productores técnicas nuevas que reemplacen el manejo tradicional. Todos estos factores justifican los esfuerzos para descubrir nuevas alternativas farmacológicas para el control de los parásitos.

Sin embargo, la investigación de nuevos compuestos antiparasitarios para uso veterinario es costosa y no atrae a la industria farmacéutica que prefiere invertir en medicamentos para humanos, un mercado mucho más rentable. Teniendo en cuenta que descubrir una nueva droga y colocarla en el mercado implica unos 10 años de trabajo y de 100 a 200 millones de dólares puede deducirse que la investigación en nuevos antiparasitarios de uso veterinario no será promisoria. Los métodos de investigación más recientes incluyen el diseño de medicamentos a través de programas de computación, screening de alto rendimiento y screening basados en mecanismos de acción. Estos sistemas permiten evaluar numerosos compuestos por día hasta lograr resultados, muchas veces logrado más por procesos intuitivos o al azar que por métodos racionales. Todos estos métodos se desarrollan en USA o Europa Occidental que poseen recursos y equipamiento adecuado. Sin embargo, inicialmente la investigación se basaba en datos etnobotánicos o etnofarmacológicos y ensayos que permitían poner en contacto los parásitos con extractos o compuestos aislados (Errecalde, 2001). Este método, aunque con limitaciones operativas y de interpretación de resultados, tales como una mala correlación entre la actividad que se expresa in vitro respecto a la encontrada in vivo, es mucho más barato y permite a grupos de investigadores de países emergentes lograr avances aprovechando los recursos naturales de cada región para sus trabajos.

Considerando que un gran número de especies vegetales han dado origen a más del 30 % de los medicamentos que se utilizan en la actualidad, entre ellos antiparasitarios, y teniendo en cuenta que todavía un gran número de plantas no han sido estudiadas, en este trabajo se investigó la actividad antihelmíntica de extractos vegetales. Este método permitirá seleccionar plantas nativas y naturalizadas de la Provincia de La Pampa, Argentina, para evaluar en estudios posteriores su potencial farmacológico en modelos in vivo.

El método empleado en este trabajo para determinar la actividad antihelmíntica de plantas utilizando modelos in vitro, no ha sido suplantado por los métodos de screening modernos como lo demuestran numerosas publicaciones recientes sobre *Duddingtonia flagrans* (Waller et al., 2006), *Sericea lespedeza* (Lange et al., 2006), *Furcraea selloa* (El-Sayed et al., 2006), *Dorycnium rectum* (Waghorn et al., 2006) y *Medicago sativa* (Manolaraki et al., 2010). También, en la actualidad se continúan realizando estudios in vivo para determinar la actividad sobre los helmintos de los taninos condensados que poseen algunas plantas. Otros estudios están orientados a determinar la correlación entre la efectividad de los extractos vegetales in vivo versus in vitro comparando además los efectos logrados respecto a las drogas utilizadas (Bizimenyera et al., 2006). Estudios como los propuestos en este trabajo, eventualmente no sólo podrán lograr fármacos, también podría pensarse en la incorporación de plantas con actividad antihelmíntica en la dieta de los animales, disminuyendo la población parasitaria en los huéspedes. Existen estudios sobre la actividad que exhiben algunas especies forrajeras como *Lotus pedunculatus* variedad Maku y *Lotus corniculatus* variedad Goldie. Los taninos condensados presentes en estas forrajeras serían los responsables del efecto antihelmíntico. Sin embargo, la utilidad de los forrajes con altas concentraciones de taninos para controlar la población de parásitos está siendo estudiada (Brunet et al., 2008) ya que desde hace años se conoce que éstos interfieren con la palatabilidad y la digestibilidad (Barry et al., 1986).

Materiales y Métodos

Modelo experimental

Se realizó un cribado para determinar el efecto antihelmíntico de distintos extractos vegetales. El modelo experimental consistió en exponer larvas III de *Haemonchus* spp. a distintas concentraciones de cada extracto vegetal y observar si estas pierden motilidad.

Extractos Vegetales

Los extractos vegetales fueron provistos por el Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos (CIDEF) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa.

Se maceraron 200 g de partes aéreas desecadas de la planta en 1000 ml de una solución etanol: agua (1:1, v/v) durante 24 h (3x). Los extractos se juntaron y fueron llevados a sequedad en rotavapor a una temperatura de 70 °C. Los extractos secos se fraccionaron en 10 frascos ampolla y se conservaron a -20 °C hasta el momento de re-realizar los ensayos.

Preparación de los extractos para realizar el cribado

Cada frasco ampolla que contenía el extracto hidroalcohólico proveniente de 20 g de partes aéreas desecadas se descongeló a temperatura ambiente. Se extrajeron 100 mg de extracto hidroalcohólico y se resuspendieron en 5 ml de agua destilada (EHR). En cada pocillo de la placa de cultivo se colocaron 25 µl, 50 µl, 100 µl y 200 µl.

Droga testigo: se utilizó Fosfamisol ® MV del Laboratorio **Biogénesis – Bagó**.

Obtención de larvas de parásitos

Las larvas se obtuvieron por cultivo de materia fecal de ovinos infectados experimentalmente con larvas III de *Haemonchus* spp. y recuperados por la Técnica de Henriksen y Korsholm (Henriksen y Korsholm, 1983). Las larvas fueron colocadas en tubos de ensayo y resuspendidas en agua corriente y conservadas a 5 °C hasta el momento del ensayo.

Cribado antihelmíntico

Los tubos de ensayo que contenían las larvas se llevaron a temperatura ambiente y se homogeneizaron suavemente. Se trasvasó a placas con pocillos una alícuota de 1 ml de modo que en cada uno de ellos quedara una cantidad similar de parásitos para facilitar la observación. Se ensayaron cuatro dosis diferentes por cada extracto adicionando 25 µl, 50 µl, 100 µl y 200 µl de EHR. Una placa fue utilizada como control adicionando los mismos volúmenes de agua destilada y otra como testigo agregando 5 µl de una dilución 1:100 v/v en agua destilada de la solución comercial de fosfamisol que contiene 4,48 g/ml.

Lectura de resultados

Considerando que este trabajo tiene por objetivo realizar un cribado para seleccionar aquellos extractos que afecten la motilidad de los parásitos, se realizaron las lecturas a las 24 h. Los resultados se expresaron como pérdida total de la motilidad (T) pérdida moderada de la motilidad (M) y sin efecto (S) (Tabla 1).



Resultados

Tabla 1: Cribado Antihelmintico. Resultados observados a las 24 h de exposición de las larvas III de *Haemonchus spp.* a distintas dosis (25 µl, 50 µl, 100 µl y 200 µl) de extractos hidroalcohólicos de plantas nativas y naturalizadas de la Provincia de La Pampa.

Planta (nombre científico)	Nombre vulgar	Efecto
<i>Artemisia verlotiorum</i>	Yuyo de San Vicente	T
<i>Sida rhombifolia</i>		T
<i>Parthenium hystrophorus</i>	Falsa altamisa	T
<i>Ambrosia tenuifolia</i>	Altamisa	M
<i>Thelesperma megapotamicum</i>	Té pampa	T
<i>Schinus fasciculatus</i>	Molle negro	M
<i>Solidago chilensis</i>	Vara de oro	T
<i>Acmella decumbens</i>	zumo	T
<i>Lippia turbinata</i>	poleo	M
<i>Lamja albida</i>	Rama negra	T
<i>Gnaphalium gaudichaudianum</i>	Marcelita, vira vira	T
<i>Foeniculum vulgare</i>	Hinojo	T
<i>Solanum eleagnifolium</i>	Revienta caballo, quillo	T
<i>Ruta chalepensis</i>	ruda	T
<i>Urtica urens</i>	ortiga	S
<i>Vinca major</i>	pervinca	T
<i>Plantago lanceolata</i>	llantén	S
<i>Artemisia annua</i>	altamisa	T
<i>Physalis viscosa</i>	camambú	M
<i>Eragrostis pilosa</i>	gramillón	M
<i>Phyla canescens</i>	Yerba del mosquito	S
<i>Althernanthera philoscerioides</i>	lagunilla	T
<i>Verbena bonariensis</i>	Verbena	S
<i>Xanthium spinosum</i>	Abrojo, cepa caballo	T
<i>Atriplex undulata</i>	Zampa blanca, zampa crespá	S
<i>Melia azedarach</i>	paraíso	T
<i>Amaranthus standleyanus</i>	Yuyo colorado	T
<i>Salix humboldtiana</i>	Sauce criollo, colorado	M
<i>Morrenia odorata</i>	Tasi	M
<i>Baccharis spartioides</i>	pichana	S
<i>Ibicella lutea</i>	Cuernos del diablo	M
<i>Tamarix gallica</i>	Tamarisco	S
<i>Trichocline sinuata</i>	Contrayerba, árnica	S
<i>Gamochaeta coarctata</i>	Vira vira	M
<i>Anthemis cotula</i>	Manzanilla amarga	M
<i>Euphorbia schickendantzii</i>	Pichoa	M
<i>Baccharis darwinii</i>	Chilquilla	M
<i>Sphaeralcea crispa</i>	Coral malvavisco	M
<i>Monnina dictyocarpa</i>	Quelén	M
<i>Margyricarpus pinnatus</i>	Monte de perdiz	T
<i>Glycyrrhiza astragalina</i>	Locancia, orozuz	T
<i>Polygonum aviculare</i>	Sanguinaria	M
<i>Berberis ruscifolia</i>	Quebrachillo, uvilla	S
<i>Acantholippia seriffioides</i>	Tomillo	M
<i>Heliotropium curassavicum</i>	Cola de perro	S
<i>Eruca vesicaria</i>	Rucula	M

Maytenus vitis idara	Chaplán	S
Acaena myriophylla	Abrojo, cadillo	S
Sphaeralcea mendocina	Malvisco	M
Prosopis flexuosa var flexuosa	Algarrobo	S
Sarcocornia perennis	Vidriera	S
Elionorus muticus	Pasto amargo	T
Verbascum thapsus	Gordolobo	S

Ref:T: se observó inhibición total de la motilidad. M: inhibición moderada. S: no se observaron efectos con respecto a los grupos control.

Los parásitos expuestos a la solución de fosfamisol mostraron inhibición total de la motilidad en todas las concentraciones utilizadas.

Discusión y Conclusiones

De las 53 especies vegetales ensayadas, 20 lograron inhibir totalmente la motilidad de las larvas, 18 lo hicieron en forma moderada y 15 no tuvieron efecto. El cribado antihelmíntico realizado en este trabajo tuvo como objetivo seleccionar las plantas con efecto promisorio para realizar estudios in vivo que permitan determinar el potencial uso de estos extractos como antiparasitarios. Debe considerarse que si bien los estudios in vitro realizados muestran efecto en aproximadamente el 71 % de

las plantas ensayadas, existe una mala correlación in vitro versus in vivo (Errecalde, 2001). Se concluye que el método utilizado en este trabajo para realizar el cribado antihelmíntico ha aportado valiosa información, sin embargo deberán realizarse otros estudios in vitro para determinar si estos extractos tienen actividad larvicida o la pérdida de motilidad observada es reversible. Otros estudios complementarios podrían aportar información sobre el posible efecto ovicida de los extractos.



Bibliografía

- Barry T.N.; Manley, T.R.; Duncan, S.J. 1986.** The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 4. Site of carbohydrate and protein digestion as influenced by dietary reactive tannin concentrations. *British Journal of Nutrition*, 55: 132-137.
- Benavides, O. 2001.** Control de las pérdidas ocasionadas por los parásitos del ganado. *Carta Fedegan*, 69: 52 – 63.
- Bizimenyera, E. S.; Githiori, J. B.; Eloff, J.N.; Swan, G.E. 2006.** In vitro activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology*, 20: 336-43.
- Brunet, S.; Jackson, F.; Hoste, H. 2008.** Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. *International Journal of Parasitology*, 38: 783-90.
- El-Sayed, M. M.; Abdel-Hameed, E. S.; El-Nahas, H. A.; El-Wakil, E. A. 2006.** Isolation and identification of some steroidal glycosides of *Furcraea selloa*. *Pharmacies*, 61: 478-82.
- Errecalde, J. 2001.** Relation drug-hostectoparasite. Workshop: Relationship between pharmacokinetics and anthelmintic efficacy of endectocides. XVIII Congress WAAVP, Stressa, Italy. Pp 181-182.
- Henriksen, S.V. AA.; Korsholm, H. 1983.** A method for culture and recovery of gastrointestinal strongyle larvae. *Norwegian Medical Veterinary*, 35: 429-430.
- Lange, K. C.; Olcott, D. D.; Miller, J. E.; Mosjidis, J. A.; Terrill, T. H.; Burke, J. M.; Kearney, M.T. 2006.** Effect of sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) fed as hay, on natural and experimental *Haemonchus contortus* infections in lambs. *Veterinary Parasitology*, 5: 273-278.
- Manolaraki, F.; Sotiraki, S.; Stefanakis, A.; Skampardonis, V.; Volanis, M.; Hoste, H. 2010.** Anthelmintic activity of some Mediterranean browse plants against parasitic nematodes. *Parasitology*, 137: 685-96.
- Mc Kenna, P. B. 1996.** Anthelmintic resistance en cattle nematodos in New Zealand. *Veterinary Journal*, 44: 76
- Nari, A.; Hansen, J.; Eddi, C.; Echevarria, F.; Maciel, E.; Caracostangolo, C.; Salles, J.; Cutulle, CH. 2000.** Protocolo de trabajo para la evaluación a campo de cepas potencialmente resistentes a los antihelmínticos. Prueba de reducción del recuento de huevos en materia fecal (FECRT). www.inia.gov.ar/producto/helminto/prot-diag.htm. 4 pp.
- Waghorn, T. S., Molan, A. L.; Deighton, M.; Alexander, R. A.; Leathwick, D. M.; McNabb, W. C.; Meagher, L. P. 2006.** In vivo anthelmintic activity of *Dorycnium rectum* and grape seed extract against *Ostertagia (Teladorsagia) circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *New Zealand Veterinary Journal*, 54: 21-7.
- Waller, P. J.; Ljungström, B. L.; Schwan, O.; Martin, L. R.; Morrison, D. A.; Rydzik, A. 2006.** Biological control of sheep parasites using *Duddingtonia flagrans*: trials on commercial farms in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavia*, 47: 23 -32

