



## TESIS DOCTORAL

---

Adassa María López González

Actividad antihelmíntica y anticoccidiósica  
de extractos procedentes de la planta  
endémica canaria *Ruta pinnata*

Instituto Universitario de Sanidad  
Animal y Seguridad Alimentaria





UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA



## Anexo I

**DÑA. MARÍA SORAYA DÉNIZ SUÁREZ, SECRETARIA DEL INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.**

### **CERTIFICA**

Que el Consejo de Doctores del Instituto en su sesión de fecha 13 de noviembre de 2015 tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada: **“Actividad antihelmíntica y anticoccidiósica de extractos procedentes de la planta endémica canaria *Ruta pinnata* ”** presentada por la doctorando Dña. Adassa María López González y dirigida por los Dres. D. Antonio Ruiz Reyes, Dña. M<sup>a</sup> Carmen Muñoz Ojeda y D. José Manuel Molina Caballero

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 73.2 del reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a dieciséis de noviembre de dos mil quince





UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA



# UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

## FACULTAD DE VETERINARIA

Instituto Universitario de Sanidad Animal y  
Seguridad Alimentaria

Programa de Doctorado: "SANIDAD ANIMAL"

### Título de la Tesis

ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA Y ANTICCODIÓLICA DE EXTRACTOS  
PROCEDENTES DE LA PLANTA ENDÉMICA CANARIA *RUTA PINNATA*

Tesis Doctoral presentada por **Dña. Adassa María López González**

Dirigida por el **Dr. Antonio Ruiz Reyes, Dra. María del Carmen Muñoz Ojeda y Dr. José Manuel Molina Caballero**

**El Director,**

Antonio Ruiz Reyes

**El Director,**

M.C. Muñoz Ojeda

**El Director,**

J.M. Molina Caballero

**La Doctoranda,**

Adassa M. López González

Arucas, noviembre 2015

**Dña. María del Carmen Muñoz Ojeda**, Dra. en Veterinaria y Profesora Titular del Área de Parasitología y Cirugía Animal, **D. José Manuel Molina Caballero**, Dr. en Veterinaria y Catedrático de Parasitología y Enfermedades Parasitarias y **D. Antonio Ruiz Reyes**, Dr. en Veterinaria y Profesor Titular del Área de Parasitología del Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología, Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

**INFORMAN:**

Que la tesis doctoral que lleva por título “**Actividad antihelmíntica y anticoccidiósica de extractos procedentes de la planta endémica canaria *Ruta pinnata***” ha sido realizada por la licenciada en Veterinaria **Dña. Adassa María López González** en el Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología, Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria bajo nuestra dirección y asesoramiento, y consideramos que cumple la normativa vigente para optar al Grado de Doctor en Veterinaria por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

En Arucas (Las Palmas) a 20 de noviembre de 2015

**Fdo. M<sup>a</sup> Carmen Muñoz Ojeda**

**Fdo. José Manuel Molina Caballero**

**Fdo. Antonio Ruiz Reyes**

<b>1. Agradecimientos .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Introducción y Objetivos.....</b>	<b>5</b>
<b>3. Revisión Bibliográfica .....</b>	<b>9</b>
<b>3.1. Haemonchosis .....</b>	<b>9</b>
3.1.1. Introducción.....	9
3.1.2. Etiología .....	9
3.1.2.1. Taxonomía .....	9
3.1.2.2. Morfología .....	11
3.1.2.3. Ciclo biológico .....	12
3.1.2.4. Epidemiología .....	14
3.1.2.5. Patogénesis .....	15
3.1.2.6. Respuesta inmune frente a nematodos gastrointestinales .....	16
3.1.2.7. Signos clínicos.....	18
3.1.2.8. Lesiones .....	19
3.1.3. Diagnóstico .....	20
3.1.3.1. Datos clínicos y epidemiológicos .....	20
3.1.3.2. Análisis de laboratorio .....	20
3.1.3.3. Necropsia.....	21
3.1.3.4. Diagnóstico serológico .....	21
3.1.3.5. Otros métodos .....	21
3.1.4. Tratamiento, profilaxis y control .....	22
3.1.4.1. Antihelmínticos sintéticos .....	22
3.1.4.2. Manejo del pasto .....	22
3.1.4.3. Suplementos nutricionales.....	22

<b>3.2. Coccidiosis.....</b>	<b>24</b>
3.2.1. Introducción .....	24
3.2.2. Etiología.....	24
3.2.2.1. Taxonomía .....	24
3.2.2.2. Morfología .....	25
3.2.2.3. Ciclo biológico.....	26
3.2.2.4. Epidemiología .....	27
3.2.2.5. Patogénesis.....	28
3.2.2.6. Respuesta inmune frente a coccidios.....	29
3.2.2.7. Signos clínicos .....	32
3.2.2.8. Lesiones .....	33
3.2.3. Diagnóstico.....	34
3.2.4. Tratamiento, profilaxis y control.....	35
3.2.4.1. Anticoccidiósicos sintéticos .....	35
3.2.4.2. Medidas higiénicas y de manejo de los animales.....	36
3.2.4.3. Suplementos nutricionales .....	37
<b>3.3. Nuevas alternativas de control terapéutico.....</b>	<b>37</b>
3.3.1. Control biológico .....	40
3.3.2. Inmunoprofilaxis .....	40
3.3.3. Selección de razas resistentes.....	41
3.3.4. Fitoterapia parasitaria.....	42
3.3.4.1. Plantas con actividad frente a nematodos .....	43
3.3.4.1.1. Ensayos <i>in vitro</i> .....	43
3.3.4.1.2. Ensayos <i>in vivo</i> .....	46

3.3.4.2. Plantas con actividad frente a coccidios .....	47
3.3.4.2.1. Ensayos <i>in vitro</i> .....	47
3.3.4.2.2. Ensayos <i>in vivo</i> .....	48
<b>3.4. Plantas medicinales en las Islas Canarias .....</b>	<b>49</b>
<b>4. Material y Métodos .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1. Material vegetal .....</b>	<b>51</b>
4.1.1. Obtención del material vegetal .....	51
4.1.1.1. Preparación de los extractos.....	51
4.1.1.1.1 Obtención de los extractos naturales.....	51
4.1.1.1.2.Obtención de cultivos <i>in vitro</i> de <i>Ruta pinnata</i> .....	52
4.1.1.2. Dilución de los extractos .....	53
<b>4.2. Animales .....</b>	<b>55</b>
4.2.1. Animales donantes de <i>Haemonchus contortus</i> .....	55
4.2.2. Animales donantes de <i>Eimeria ninakohlyakimovae</i> .....	55
<b>4.3. Parásitos.....</b>	<b>56</b>
4.3.1. Recolección, purificación y concentración de huevos de <i>H.contortus</i> .....	56
4.3.2. Obtención, concentración y purificación de larvas 3 de <i>H.contortus</i> .....	56
4.3.3. Recogida y purificación de vermes de <i>H.contortus</i> .....	57
4.3.4. Obtención de ooquistes de <i>E. ninakohlyakimovae</i> .....	58
4.3.5. Purificación y concentración de ooquistes no esporulados.....	59
4.3.6. Obtención de esporozoítos de <i>E. ninakohlyakimovae</i> .....	60
4.3.7. Células hospedadoras .....	61
<b>4.4. Ensayos <i>in vitro</i> con nematodos .....</b>	<b>62</b>
4.4.1. Ensayos de eclosión de huevos (EEH).....	62

4.4.2. Ensayos de desarrollo larvario (EDL).....	63
4.4.3. Ensayos de p�alisis larvaria (EPL) .....	63
4.4.4. Ensayos de viabilidad de adultos (EVA) .....	65
<b>4.5. Ensayos <i>in vitro</i> con coccidios .....</b>	<b>66</b>
4.5.1. Ensayos de inhibición de la esporulación (EIE) .....	66
4.5.2. Ensayos de viabilidad de esporozoítos (EVE) .....	68
4.5.3. Ensayos de inhibición de la invasión celular (EIIC).....	69
4.5.3. Ensayos <i>in vitro</i> de citotoxicidad.....	70
<b>4.6. Ensayos <i>in vivo</i> con nematodos y coccidios .....</b>	<b>70</b>
4.6.1. Reactivación de las cepas.....	70
4.6.2. Material vegetal .....	71
4.6.3. Viabilidad y efecto de las larvas 3 utilizadas en el ensayo <i>in vivo</i> .....	71
4.6.4. Diseño experimental .....	72
4.6.5. Inoculaciones.....	73
4.6.5.1. Inoculación de las larvas 3 de <i>H. contortus</i> .....	73
4.6.5.2. Inoculación de los ooquistes de <i>E. ninakohlyakimovae</i> .....	73
4.6.6. Toma de muestras y procesado .....	74
4.6.7. Tratamientos .....	75
<b>4.7. Procesamiento de los datos y análisis estadístico .....</b>	<b>75</b>
4.7.1. Análisis de los datos obtenidos en los ensayos <i>in vitro</i> .....	75
4.7.2. Análisis de los datos obtenidos en los ensayos <i>in vivo</i> .....	76
<b>5. Resultados.....</b>	<b>79</b>
<b>5.1. Evaluación de la actividad antiparasitaria mediante ensayos <i>in vitro</i>.....</b>	<b>79</b>
5.1.1. Estudio de la actividad antihelm�tica .....	79

5.1.1.1. Actividad antihelmíntica en parte aérea sin fructificar .....	79
5.1.1.2. Actividad antihelmíntica de frutos.....	84
5.1.1.2.1. Estudio comparativo mediante EPL en frutos de <i>R. pinnata</i> con diferentes grado de maduración utilizando distintos disolventes .....	85
5.1.1.2.2. Actividad ovicida, larvicida y adulticida de frutos maduros de <i>R. pinnata</i> mediante EEH, EDL y EVA .....	88
5.1.1.3. Actividad antihelmíntica de cultivos <i>in vitro</i> de <i>R. pinnata</i> .....	91
5.1.1.3.1. Estudio comparativo mediante EPL de extractos metanólicos obtenidos de cultivos <i>in vitro</i> de material vegetal de <i>R. pinnata</i> en diferentes medios .....	91
5.1.1.3.2. Estudio comparativo mediante EPL de extractos elaborados a partir de cultivos <i>in vitro</i> de <i>R. pinnata</i> utilizando distintos disolventes ..	92
5.1.1.3.3. Estudio comparativo mediante EVA de extractos metanólicos obtenidos de cultivos <i>in vitro</i> de material vegetal de <i>R. pinnata</i> en diferentes medios .....	94
5.1.2. Estudio de la actividad anticoccidiósica .....	95
5.1.2.1. Ensayo de inhibición de la esporulación .....	95
5.1.2.1.1. Evaluación de la actividad anticoccidiósica de diferentes extractos metanólicos .....	96
5.1.2.1.2. Actividad anticoccidiósica de extractos acuosos de frutos maduros de <i>R. pinnata</i> .....	98
5.1.2.1.3. Evaluación de la actividad anticoccidiósica de compuestos elaborados a partir de cultivos <i>in vitro</i> de <i>R. pinnata</i> .....	99
5.1.2.1.4. Estudio dosis-dependiente de la actividad anticoccidiósica en diferentes periodos de incubación.....	100
5.1.2.2. Ensayo de viabilidad de esporozoítos .....	103
5.1.2.3. Ensayo de inhibición de la invasión celular.....	104

<b>5.2. Evaluación de la citotoxicidad de los extractos .....</b>	<b>106</b>
<b>5.3. Evaluación de la actividad antiparasitaria mediante ensayos <i>in vivo</i>.....</b>	<b>107</b>
5.3.1. Sintomatología .....	107
5.3.2. Estudio de la actividad antihelmíntica .....	109
5.3.3. Estudio de la actividad anticoccidiósica .....	111
<b>6. Discusión .....</b>	<b>119</b>
<b>6.1. Ensayos <i>in vitro</i> .....</b>	<b>120</b>
6.1.1. Actividad antihelmíntica .....	120
6.1.2. Actividad anticoccidiósica .....	127
<b>6.1. Ensayos <i>in vivo</i> .....</b>	<b>131</b>
<b>7. Conclusiones.....</b>	<b>139</b>
<b>8. Resumen/Summary.....</b>	<b>141</b>
<b>9. Bibliografía.....</b>	<b>145</b>

# Agradecimientos

---



La realización de esta tesis ha sido financiada en base a los siguientes proyectos de investigación:

**Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (ACIISI)**

PROYECTO: SoSub 2008010000244

PROTEÓMICA E INMUNOLOGÍA APLICADA A LA PROFILAXIS Y CONTROL DE LA COCCIDIOSIS CAPRINA PRODUCIDA POR *EIMERIA NINAKOHLIYAKIMOVAE*

**Ministerio de Educación y Ciencia, Innovación Tecnológica 2008-2010 PROYECTO:**

AGL2007-63415

RESPUESTA INMUNE Y MECANISMOS DE PATOGENICIDAD EN LA COCCIDIOSIS CAPRINA:  
IMPLICACIONES EN LA PROFILAXIS Y CONTROL DE LA ENFERMEDAD

La realización de esta tesis ha sido financiada por:

**Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información a través del Programa de Formación de Personal Investigador 2010-2014**

## AGRADECIMIENTOS

Son muchas a las personas a las que tendría que agradecerles su participación y apoyo durante los años que he dedicado a la tesis. A cada uno de ellos podría escribirle páginas y páginas para poder agradecerles todo lo que han hecho por mí. Sin duda, creo que va a ser el capítulo más difícil de escribir.

En primer lugar, quisiera agradecerle a mi director de tesis, Antonio Ruiz, o como él mismo nos dice “nuestro padre científico”, por la confianza depositada en mí desde el principio, así como su amistad, apoyo y consejo cuando fue necesario. Para mí ha sido un orgullo no sólo trabajar con un excelente profesional, sino también al lado de una gran persona.

También tengo que agradecer todo el tiempo dedicado y apoyo a mis codirectores de tesis, Mari Carmen Muñoz y José Manuel Molina, muchas gracias por estar siempre disponibles para cualquier cosa que necesitara.

Durante estos años he tenido la suerte de conocer, convivir y trabajar al lado de una persona a la que considero un ejemplo a seguir. Nunca he conocido a alguien que disfrute tanto con su trabajo, esforzándose día a día por superarse en todo lo que hace. Muchas gracias Sergio Martín, por transmitirme ese entusiasmo, ayudarme en cada cosa que te pedí, por tu cariño y por recibirme en casa cada día con una sonrisa.

A lo demás miembros del área de Parasitología, Otilia, Magnolia, Eligia y Jorge por su apoyo y ayuda, así como a todas las personas que trabajan de una forma u otra en el laboratorio; Esther, Estrella, Irene, Lita, Luis, Santiago, Juan.... Gracias a todos.

A mis compañeros de laboratorio; Lorena, Davinia, Yaiza, Soraya, Julia, Sara, Rosa, Ada, Aranza, Jessica, Pablo, Yeray y Álvaro, gracias por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos. No podría olvidarme de mis biólogos preferidos, Leire y Fernando, nunca podré agradecer su amistad incondicional y el apoyo que me dieron cuando más lo necesité. Gracias a ustedes dos, los últimos años de trabajo fueron menos duros.

Muchas gracias a todos los compañeros becarios, Elena, Alejandro, Judith, Lidia, Aridany, Belinda, Fátima... por estar siempre disponible y, también, a profesores de otras áreas, Anselmo Gracia, Begoña Acosta, Soraya Deníz..., por cedernos sus laboratorios y material cuando nos hizo falta.

A mi familia, ese rebaño que siempre me acompaña y apoya en todas las decisiones que he tenido que tomar a lo largo de estos años, en especial a mis padres, hermanos y a mi tía Pepa. A mi abuelo José... todos los días me acuerdo de la ilusión que te hacía el que tu nieta fuera veterinaria y trabajara con cabras; y a mi abuelilla M<sup>a</sup> Antonia, quien por sólo por unos meses no pudo vivir este momento con nosotros.

A mis amigos, simplemente por preguntar: “¿Cuándo lees la tesis? Avísanos para ir a verte”

A los compañeros veterinarios y ganaderos que forman parte de la ADS Caprino de Gran Canaria, por cedernos animales, abrirnos las puertas de sus granjas y facilitarnos muchísimo el trabajo de campo.

A los componentes del Institut für Parasitologie Justus-Liebig Universität Giessen en Alemania, por acogerme durante mi estancia como uno más de su grupo de investigación.

Al Centro Atlántico del Medicamento (CEAMED) por la aportación económica al proyecto así como al Instituto de Biorgánica Antonio Padrón en Tenerife por la elaboración y cesión de extractos utilizados en el trabajo.

¡Muchas gracias a todos!

# Introducción y Objetivos

---



## 2.1. INTRODUCCIÓN

Entre las múltiples afecciones parasitarias que pueden afectar a los animales domésticos de abasto, las patologías originadas por los helmintos y coccidios se extienden por todo el mundo considerándose de las parasitosis más generalizadas y que inciden con más severidad en las explotaciones ganaderas, registrándose altas tasas de morbilidad y ocasionando cuantiosas pérdidas económicas.

Entre las distintas nematodosis gastrointestinales que afectan al ganado ovino y caprino destacan las producidas por la familia *Trichostrongylidae*, siendo *Haemonchus contortus* una de las especies más patógenas. En su fase adulta, este nematodo se localiza en el abomaso, donde se alimenta de sangre, por lo que los animales afectados pueden presentar anemia severa, además de otros signos, entre ellos diversas alteraciones gastrointestinales, edema y pérdida de peso.

Por otro lado, la coccidiosis en rumiantes es la denominación que se atribuye a las infecciones producidas por las diferentes especies del género *Eimeria*. Una de las especies más patógenas que afectan al ganado caprino es *Eimeria ninakohlyakimovae*. Este coccidio afecta principalmente a cabritos comprendidos entre las 2 semanas y 4 meses de edad, con una prevalencia de hasta un 30 % en las granjas de la Isla de Gran Canaria. Los signos clínicos que acompañan a la infección por *E. ninakohlyakimovae* se ven agravados debido a la replicación masiva en las células endoteliales hospedadoras, lo cual da lugar a la destrucción generalizada de la mucosa intestinal. Este hecho se manifiesta en el animal con graves cuadros diarreicos, en ocasiones hemorrágicos, frecuentemente acompañado de mucus e incluso de restos de la mucosa intestinal. Otros signos que acompañan la parasitación por esta especie de *Eimeria* incluyen debilidad, anorexia, pérdida de peso y retraso en el crecimiento de los animales infectados.

Para el tratamiento y control de las enfermedades parasitarias se utilizan comúnmente agentes químicos, combinados con prácticas de pastoreo que limiten el contacto entre el parásito y el hospedador, así como mejora en el manejo y limpieza de la explotación, siendo los beneficios de la utilización de estos métodos incuestionables. Sin embargo, diversas circunstancias como el elevado coste invertido en los tratamientos antiparasitarios, el aumento del interés de los consumidores por métodos de producción orgánicos y sostenibles, la publicación de nuevas leyes que restringen cada vez más el uso de aditivos y fármacos en producción animal, así como la creciente aparición de resistencias están teniendo un fuerte impacto sobre la productividad. Este último aspecto se considera de especial interés, ya que la pérdida de eficacia de los productos comerciales disponibles, especialmente cuando estos productos se han utilizado como la única acción terapéutica de control, podría derivar en una situación preocupante. Ante esta situación, se ha promovido el desarrollo de nuevas técnicas de control y tratamiento frente a las parasitosis, por ejemplo, el control inmunológico, la selección de razas resistentes, el control biológico o la fitoterapia.

La posibilidad de encontrar principios activos y/o extractos naturales a partir de plantas que sean útiles en producción animal constituye una alternativa muy prometedora, más si cabe, teniendo en cuenta que los hallazgos que se realicen de forma general en la medicina veterinaria en este ámbito, podrían ser también de interés en el marco de la conservación de la biodiversidad vegetal. De hecho, la importancia de este tipo de trabajos recae, no exclusivamente en la posibilidad de demostrar el efecto terapéutico de las plantas, la determinación y análisis de los compuestos a los que se adscriben sus propiedades, o la elucidación de los mecanismos intrínsecos de actuación, sino también en la posibilidad de subrayar el interés y potencialidad que supone rescatar el conocimiento popular en etnobotánica, conservar la diversidad florística de una región y mantener un desarrollo agroecológico sostenible en nuestro entorno.

Se han descrito numerosas plantas que poseen actividad antiparasitaria, no sólo frente a nematodos o protozoos, sino también frente a otros grupos parasitarios como trematodos, cestodos y artrópodos. En medicina veterinaria, *H. contortus* ha sido uno de los parásitos donde más se ha investigado el efecto antihelmíntico de productos naturales de origen vegetal en diferentes partes del mundo. Sin embargo, los estudios de fitoterapia enfocados al control de la coccidiosis caprina y, en general, de rumiantes, son escasos.

Las Islas Canarias son un reducto de biodiversidad donde tradicionalmente se han usado plantas, sobre todo endemismos, para el tratamiento de diversas enfermedades, entre ellas las plantas pertenecientes a la familia de las rutáceas. A esta familia de plantas se le atribuyen propiedades dermatológicas, pero también se han usado como agentes espasmolíticos, antirreumáticos, analgésicos o como alternativa al tratamiento de la alopecia en humanos, entre otras. Se desconoce mucho sobre el uso de las rutáceas en medicina veterinaria, y, aunque se ha descrito su utilización como parte de la alimentación del ganado, principalmente cuando presentan parasitaciones digestivas, no existen evidencias científicas que demuestren su efecto antiparasitario.

## 2.2. OBJETIVOS

### 2.2.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad antihelmíntica y anticoccidiósica frente al nematodo de pequeños rumiantes *Haemonchus contortus* y al coccidio caprino *Eimeria ninakohlyakimovae* de extractos procedentes de diversas plantas de la flora canaria, en particular de la especie endémica *Ruta pinnata*.

### 2.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Valorar y comparar la actividad antihelmíntica y anticoccidiósica mediante ensayos *in vitro* de extractos metanólicos elaborados a partir de la parte aérea sin fructificar de tres plantas pertenecientes a la flora canaria: *Ruta pinnata*, *Psoralea bituminosa* y *Ruta graveolens*.
- Evaluar y comparar la actividad antihelmíntica y anticoccidiósica mediante ensayos *in vitro* de extractos metanólicos y sus fracciones, elaborados a partir de frutos en distintos estados de maduración de *Ruta pinnata*.
- Profundizar en la evaluación de la actividad antihelmíntica y anticoccidiósica utilizando ensayos *in vitro* del extracto metanólico de frutos maduros de *Ruta pinnata*.
- Estudiar la actividad antihelmíntica y anticoccidiósica empleando ensayos *in vitro* de compuestos metanólicos, y sus fracciones, elaborados a partir de cultivos *in vitro* de material vegetal de *Ruta pinnata*.
- Evaluar la citotoxicidad *in vitro* de *Ruta pinnata* en cultivos celulares de células epiteliales de colon bovino (BCECs) y células VERO (African Green monkey kidney cells).
- Investigar la actividad antiparasitaria de dos extractos (natural y procedente de cultivos *in vitro*) de *Ruta pinnata* mediante ensayos *in vivo*.

# Revisión Bibliográfica

---



## 3.1. HAEMONCHOSIS

### 3.1.1. INTRODUCCIÓN

La haemonchosis producida por *Haemonchus contortus* en los pequeños rumiantes se incluye dentro un conjunto de enfermedades parasitarias que se conocen comúnmente como nematodosis gastrointestinales. Suelen ser infecciones mixtas, es decir, producidas por diversas familias y géneros, destacando las siguientes: *Trichostrongylidae* (*Haemonchus*, *Ostertagia*, *Teladorsagia*, *Trichostrongylus*, *Marshallagia*, *Cooperia*); *Molineidae* (*Nematodirus*); *Ancylostomatidae* (*Bunostomum*) y *Strongylidae* (*Chabertia* y *Oesophagostomum*) (Meana y Rojo, 2000). Dependiendo de la especie, estos vermes se localizan en distintos tramos del aparato digestivo: abomaso, intestino delgado e intestino grueso.

Todas estas especies son parásitos vermiformes de sección redondeada, de color blanquecino o rojizo (si desarrollan hematofagia), con unas medidas que oscilan entre un par de milímetros y tres o cuatro centímetros. La cutícula puede ser lisa o estriada, más o menos ornamentada y, a veces, puede presentar expansiones cuticulares en el extremo anterior. A nivel del extremo posterior de los machos, las expansiones de la cutícula forman una estructura conocida como bolsa copuladora, donde se localizan diversas estructuras quitinosas que intervienen en la cópula.

Las hembras producen huevos que son ovoides, de cáscara fina, y que salen al medio con las heces en fase de blástula. Continúan su desarrollo en el medio bajo condiciones ambientales apropiadas hasta que eclosiona la larva (L1) de su interior, la cual, bajo las mismas condiciones, experimentará dos mudas (L2 y L3) para alcanzar finalmente el estado de L3, que será infectante.

### 3.1.2. ETIOLOGÍA

#### 3.1.2.1. Taxonomía

Dentro del amplio conjunto de especies responsables de “gastroenteritis parasitarias” en pequeños rumiantes, uno de los encuadres taxonómicos reconocidos actualmente para *Haemonchus contortus* (*H. contortus*) sería el siguiente (Rudolphi, 1808; Wilford Olsen/Cordero del Campillo, 1977; Leiper, 1912; Coob, 1898):

**PHYLUM:** Nematoda

**CLASE:** Nematoda

**SUBCLASE:** Rhabditia

**ORDEN:** Strongylida

**SUBORDEN:** Strongylina

**FAMILIA:** Trichostrongylidae

**GÉNERO:** *Haemonchus*

Aparte de *H. contortus* (**Rudolphi, 1803**), descrito como parásito del cuajar de ovejas, cabras y, en menor medida, de bovinos y otros numerosos rumiantes en casi todas las zonas del mundo, se han identificado otras especies diferentes dentro del género. **Gibbons (1979)** reconoce la existencia de un total de nueve especies pertenecientes al género *Haemonchus*. Por otro lado, autores como **Das y Whitlock (1960)**, en base a diferencias morfológicas, propusieron la existencia de dos nuevas subespecies y una nueva variedad de *H. contortus*, denominadas *H. contortus contortus* (Australia), *H. contortus cayugensis* (EEUU) y *H. contortus* var. *utkalensis* (India). Posteriormente se identificaron otras subespecies, como *H. contortus bangalorensis* (India), *H. contortus hispanicus* (España) y *H. contortus kentuckiensis* (EEUU). Según **Daskalov (1972)**, el hospedador sería el principal responsable de la aparición de las diferentes subespecies de este parásito, sin dejar al margen la influencia de los factores geográficos y ecológicos.

Actualmente, también se reconoce como especie dentro del género a *H. placei* (Place, 1983; Ransom, 1911). La propuesta inicial de estos autores fue contrastada por **Roberts et al. (1954)** tras diversos estudios realizados con rumiantes parasitados por *Haemonchus* spp., a partir de los cuales concluyen que bovinos y ovinos están parasitados por dos especies distintas de este género, *H. placei* y *H. contortus*, respectivamente.

Dentro de este mismo género se ha incluido también a la especie *Haemonchus similis* (Travassos, 1914), encontrada en bóvidos y cérvidos en Florida, Luisiana y Texas, además de en rumiantes de Europa y Brasil. En ciertas regiones de África, donde los rumiantes comparten los mismos pastos durante todo el año, es común encontrar infecciones mixtas por *H. placei*, *H. contortus* y *H. similis*. En este caso, la última especie citada es la predominante en bovinos de razas autóctonas (**Achi et al., 2003**).

Finalmente, se ha descrito la presencia de *H. longistipes* (Pailliet y Henry, 1909), en camellos y dromedarios, así como otras especies en rumiantes silvestres del África austral, entre ellas, *H. bedfordi* (Le Roux, 1929), *H. dinniki* (Sachs, Gibbons y Leveno, 1973), *H. krugeri* (Ortlepp, 1964), *H. lawewnci* (Sandground, 1933), *H. mitchelli* (Le Roux, 1929), *H. vegliai* (Le Roux, 1929), *H. okapiae* (van den Berghe, 1937) y *H. horaki* (**Lichtenfels et al., 2001**).

### 3.1.2.2. Morfología

*H. contortus* se encuentra englobado en la superfamilia Trichostrongyloidea, considerándose la especie de mayor longitud entre los nematodos gastrointestinales con bursa (**Anderson, 1992**). Los trichostrongylidos constituyen un grupo de nematodos, por lo general, pequeños, frecuentes patógenos de los rumiantes en pastoreo, que tienen la apariencia de un pelo, y que suelen alojarse (salvo *Dyctiocaulus*, que se localiza en vías respiratorias) en el tracto digestivo de mamíferos y aves (**Anderson, 1992; Urquhart et al., 2001**). Existen, sin embargo, otros géneros que parasitan la cavidad nasal (género *Nasistrongylus*), conductos biliares (género *Hepatojarakus*) y glándula mamaria (género *Mammanidula*) de sus hospedadores (**Anderson, 1992**).

Los miembros de esta superfamilia no presentan estructuras muy llamativas y su cápsula bucal es muy reducida. Sin embargo, en los machos destaca la presencia de bolsas copuladoras desarrolladas con dos espículas, cuyas características morfológicas se utilizan para su diferenciación (**Urquhart et al., 2001**).

*Haemonchus spp.* (**Cobb, 1898**), uno de los géneros parásitos del cuajar de diversos rumiantes con mayor potencial patógeno, tiene una longitud que oscila entre los 10-30 mm, siendo las hembras mayores que los machos. Poseen una pequeña cápsula bucal con un fino diente o lanceta, así como papilas cervicales prominentes. La bolsa copuladora del macho es grande, en especial los lóbulos laterales, siendo el lóbulo dorsal pequeño y asimétrico. La vulva se sitúa en el tercio posterior y puede contar con una protuberancia, solapa o proceso lingüiforme.

*H. contortus* (**Rudolphi, 1803**) se localiza en el cuajar de ovejas y cabras en casi todas las zonas del mundo. Se conoce vulgarmente como gusano rojo del cuajar de los rumiantes y es una de las especies más patógenas. Los machos miden de 10 a 22 mm de longitud, y las hembras de 18 a 34 mm (**Soulsby, 1988**). El macho de esta especie presenta un color rojizo uniforme, mientras que en la hembra, los ovarios blancos enrollados en espiral alrededor del intestino rojo le dan un aspecto rayado característico. Presenta unas crestas cuticulares en la superficie que van desde el extremo anterior hasta más allá de la mitad del cuerpo (**Lichtenfels y Pilitt, 2000**), si bien se han observado ciertas diferencias en este sentido, según el grado de adaptación al hospedador (ovino o caprino) (**Wahab y Suhalia, 2007**). Disponen de una pequeña cavidad bucal que contiene una lanceta dorsal con la que erosionan la mucosa gástrica (**Meana y Rojo, 2000**).

Los huevos liberados por las hembras tienen forma ovoide, son de cáscara fina y presentan un tamaño que oscila entre 67-85 x 41-48 µm. Salen al exterior con las heces en forma de blástula con 16-32 blastómeros (**Soulsby, 1988; Anderson, 1992**).

La primera fase larvaria (L1) mide 340-350 µm de longitud y presenta un bulbo esofágico, una cola puntiaguda prominente y una cavidad bucal tubular. El segundo estadio larvario (L2) es algo mayor y también posee bulbo esofágico. Tras la segunda muda, se desarrollan las larvas de tercer estado (L3), que miden alrededor de 754-756 µm de longitud y que están recubiertas por una vaina, la cual no es sino la cutícula de la L2. La cola de este estado larvario es de tamaño medio y su extremo anterior

estrecho y redondeado, características que se utilizan para diferenciar las larvas de *Haemonchus* de las L3 de otros géneros dentro de la superfamilia (MAFF, 1989).

El cuarto estado larvario (L4) tiene una longitud de 750-850  $\mu\text{m}$  y presenta una cápsula bucal provisional que le permite ingerir sangre. Antes de evolucionar a estado adulto, pasa por una fase denominada L5 o preadulto, que ya posee caracteres sexuales diferenciados.

### 3.1.2.3. Ciclo Biológico

#### Fase exógena

*H. contortus* tiene un ciclo biológico directo típico de la superfamilia Trichostrongyloidea (Soulsby, 1988; Urquhart *et al.*, 2001). Los animales parasitados eliminan huevos que salen al medio junto con las heces del hospedador y allí evolucionan hasta el estado de L3 (envainada), que es la forma infectante. La infección se produce de forma pasiva por la ingestión de las L3, cuyo posterior desarrollo hasta el estado adulto se produce en la localización final, el abomaso, sin llegar a producir ningún tipo de migración orgánica (Fig. 1) (Urquhart *et al.*, 2001).

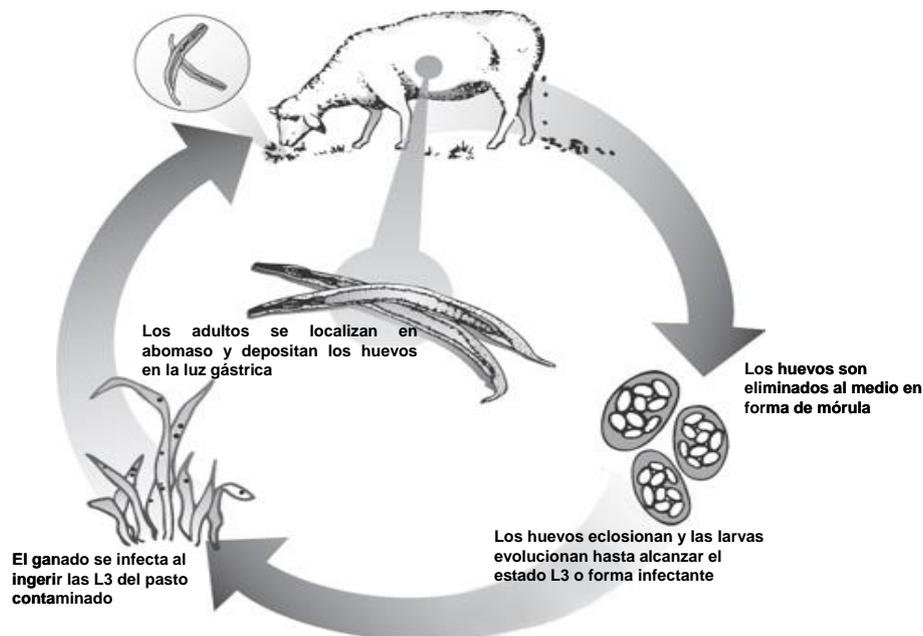


Figura 1. Ciclo biológico de *Haemonchus contortus*.

Las hembras son ovíparas y son capaces de eliminar entre 5.000 y 10.000 huevos/día (Meana y Rojo, 2000). Los huevos se desarrollan a medida que discurren por el intestino del hospedador y posteriormente en el medio, siendo aquellos que alcanzan el estado de pre-eclosión más resistentes a condiciones adversas como la congelación o la desecación (Soulsby, 1988). Según algunos autores, la masa fecal

serviría de protección frente a condiciones ambientales desfavorables (**Zajac, 2006**) y la humedad favorecería la eclosión de los huevos (**O'Connor et al., 2006**). Se considera que la temperatura óptima para el desarrollo exógeno del parásito oscila entre 20 y 30 °C. No obstante, es importante tener en cuenta que, incluso dentro de condiciones medioambientales aceptables, cada especie parásita puede desarrollar adaptaciones locales.

Dentro del rango de temperatura señalado se suceden las dos primeras mudas (**Zajac, 2006**), pero el tiempo en alcanzar el estado de L3 también depende de la temperatura; así, en veranos calurosos, el desarrollo de las larvas puede tardar 3 o 4 días, mientras que, si los huevos son depositados en primaveras frías, el desarrollo puede verse retrasado varios meses (**Zajac, 2006**). Esta fase larvaria se caracteriza por contar con una vaina que le proporciona gran resistencia frente a distintos factores ambientales, pero evita que las larvas se alimenten, por lo que mueren una vez que las L3 consumen sus reservas nutritivas acumuladas durante las fases previas. Por este motivo, las larvas que eclosionan en periodos con temperaturas más bajas cuentan con menos movilidad y tienden a sobrevivir durante más tiempo (**Zajac, 2006**).

Los huevos no se desarrollan por debajo de los 4 °C, y pueden no continuar su desarrollo cuando se eleva la temperatura. Las larvas 3 suelen sobrevivir a temperaturas bajas, pero a temperaturas altas pueden morir, así como en heces en descomposición. La humedad fecal normal es adecuada para la L1 y la L2, pero no para la L3, que necesita de mayor humedad (**O'Connor et al., 2007**). Este factor, junto con la lluvia, son muy importantes para que el tercer estadio abandone el material fecal y se produzca la migración hacia el pasto, por lo que, en periodos secos, un mayor porcentaje de larvas quedará retenida en el estiércol (**Zajac, 2006**). También otros factores como la intensidad de la luz, el viento o el transporte en invertebrados pueden favorecer la migración de las L3 hacia la hierba.

#### *Fase endógena*

A los 30 minutos de su ingestión, aproximadamente, las larvas infectantes (L3) se desprenden de la vaina por efecto de distintos estímulos del hospedador. Estos estímulos hacen que la larva segregue un fluido de muda que actúa sobre la cutícula provocando su ruptura, con lo que la larva, ayudada por sus movimientos, puede salir. La pérdida de la vaina se produce en el rumen y, a continuación, las fases larvarias del parásito migran al cuajar penetrando entre las glándulas epiteliales gástricas (**Meana y Rojo, 2000**).

Una vez en la mucosa, las larvas mudan otra vez y se transforman en L4 en el interior de las glándulas. Estas larvas son capaces de ingerir sangre y causar pequeñas hemorragias a partir de los 3 días postinfección. Después de la última muda se transforman en L5 o preadultos, que maduran sexualmente y pasan a adultos (**Anderson, 1992**). Los adultos machos y hembras se mueven libremente por la superficie de la mucosa, y en ella se produce la fecundación. Las hembras son capaces de poner huevos a partir de los 15 días postinfección, sin embargo, en algunos casos, el

periodo de prepatencia se prolonga hasta las 3 semanas (**Anderson, 1992; Urquhart et al., 2001**).

#### 3.1.2.4. Epidemiología

*H. contortus* es un parásito que tiene distribución mundial y se puede hallar parasitando a los pequeños rumiantes de distintas zonas y climas del mundo. En Estados Unidos de América, se ha estimado que el 74 % de las ovejas se encuentran parasitadas por vermes gastrointestinales, siendo *H. contortus* la especie más importante (**Zajac, 2006**). En zonas geográficas con climas tropicales como Nigeria, se ha citado una prevalencia del 64,3 % (**Behnke et al., 2006**), y en áreas de climas subtropicales como América Central se ha observado que un 3,6 % del total de larvas encontradas en el pasto son de *H. contortus* (**Abarca, 1990**). Por otro lado, en Brasil, se ha estimado que la prevalencia en granjas de pequeños rumiantes es del 62,9 %, siendo el nematodo gastrointestinal predominante frente a otros, como *Trichostrongylus spp.* o *Cooperia spp.* (**de Souza et al., 2013**). En nuestro entorno más cercano, considerado también como de clima subtropical (isla de Gran Canaria, España), la prevalencia se ha estimado en un 15,2 % (**Molina et al., 1997**). Una prevalencia similar se ha registrado en la Península Ibérica, con valores en torno al 15-20% en granjas de ovinos del Valle del Ebro (**Uriarte et al., 2003**). También se ha descrito una elevada prevalencia de *Haemonchus* en zonas climáticas tan distintas como Zimbabwe, de clima semiárido (**Pandey et al., 1994**), o Suecia, donde la temperatura media anual ronda los 7-8 °C (**Lindqvist et al., 2001**), y en áreas geográficas tan dispares como Turquía (**Altas et al., 2009**), China (**Wang et al., 2006**), India (**Tariq et al., 2008**) o Malasia, donde recientemente se ha descrito una prevalencia del 86,86 % de *H. contortus* en el ganado caprino del país (**Zainalabidin et al., 2015**).

En cualquier área geográfica concreta (tropical, subtropical o templada), el estudio de los aspectos epidemiológicos de una enfermedad parasitaria permite realizar una estimación de la disponibilidad estacional de las larvas, las variaciones de la carga parasitaria, así como de las fuentes de contaminación (**Urquhart et al., 2001**). También ha de tenerse en cuenta que el crecimiento de la población en el hospedador y, consecuentemente, el aumento de la excreción de huevos, están sujetos a factores como la disponibilidad de larvas infectantes en el pasto, la inhibición del desarrollo larvario y al estado inmunitario de los animales (**Meana y Rojo, 2000**). Fuera del hospedador, el desarrollo y la supervivencia dependen, sobre todo, de la temperatura y la humedad, como quedó recogido en el apartado anterior.

En ciertas áreas tropicales y subtropicales, la supervivencia de los parásitos está condicionada por la capacidad de hipobiosis de las larvas de *H. contortus*. Aunque se desconoce el estímulo para desencadenar este fenómeno, la hipobiosis ocurre al inicio de una prolongada estación seca y permite al parásito sobrevivir en el hospedador como L4 inhibida en lugar de madurar y producir huevos que no se desarrollarían en el pasto árido (**Urquhart et al., 2001**). Este fenómeno también se ha observado en climas semiáridos o en climas de tipo tropical seco, como en Sudáfrica, donde el desarrollo de

las larvas hipobióticas continúa justo antes del inicio de las estaciones lluviosas de noviembre y diciembre (**Taylor et al., 2005**). Lo mismo ocurre en zonas de clima tropical lluvioso como en Kenia (**Nginyi et al., 2001**). La hipobiosis también se ha observado en climas fríos (Suecia), donde casi el 100 % de las L4 detiene su desarrollo durante las épocas con temperaturas más bajas, y no es sino hasta el próximo verano cuando reactivan su ciclo (**Waller et al., 2004**).

En áreas geográficas con climas templados, las condiciones ambientales en determinadas épocas del año son, en general, menos favorables para la supervivencia de *H. contortus*, por lo que la epidemiología es diferente a la de zonas tropicales. En estas zonas, las infecciones se desarrollan normalmente en dos circunstancias. En una de ellas, probablemente la más común, acontece el denominado ciclo sencillo anual, donde las larvas infectantes que se han desarrollado de los huevos depositados en primavera son ingeridas por el hospedador a principios de verano, quedando la mayoría de ellas inhibidas en el abomaso como L4 sin completar el desarrollo hasta la primavera siguiente. En estas circunstancias, la maduración de las larvas hipobióticas se encuentra ligada en muchos casos a brotes agudos de haemonchosis. Otra posibilidad de que aparezcan signos clínicos puede acontecer a finales de verano en corderos infectados a partir de pastos contaminados con larvas que no realizaron la hipobiosis al inicio del verano (**Urquhart et al., 2001**).

### 3.1.2.5. Patogénesis

La principal característica de la infección por *Haemonchus* spp. es la anemia. Tanto los adultos como las larvas de cuarto y quinto estado de *H. contortus* en pequeños rumiantes y de *H. placei* en vacas son hematófagos, considerándose responsables de lesiones hemorrágicas en el cuajar. La pérdida de sangre se ha calculado en 0,05 ml por parásito y día, atribuibles tanto a la ingestión como al sangrado de las heridas que produce, de modo que un hospedador parasitado con 5000 adultos de *H. contortus* podría perder alrededor de 250 ml de sangre al día. La sangre aparece en las heces a los 6-12 días de la infección (**Clark et al., 1962**). Sin embargo, en condiciones naturales, *H. contortus* coexiste normalmente con varias especies de nematodos parásitos diferentes con mecanismos de acción patógena distintos y localizaciones en diversos tramos del tracto gastrointestinal. La acción patógena total, cuya gravedad depende principalmente de la edad del hospedador y de la intensidad de la infección, sería la suma de la acción patógena de cada una de las especies que se ven implicadas (**Meana y Rojo, 2000**).

No obstante, la acción patógena de *H. contortus* comienza a ser patente ya con la presencia de las L3, que son capaces de provocar alteraciones en la permeabilidad de la mucosa abomasal (**Dakkak et al., 1981**). Los estados tempranos larvarios también se ha demostrado que pueden inducir cambios en la actividad secretora del abomaso, aunque mucho menores que los producidos posteriormente por los adultos (**Simpson et al., 1997**). La penetración y crecimiento de las larvas en el interior de la mucosa originan la dilatación y protrusión de las glándulas gástricas, las cuales serán

reemplazadas más tarde por células no diferenciadas, siendo en esta localización donde tienen lugar los principales cambios funcionales y morfológicos (**Soulsby, 1988**).

### 3.1.2.6. Respuesta inmune frente a nematodos gastrointestinales

Las infecciones por nematodos gastrointestinales inducen en el hospedador respuestas inmunitarias protectoras que vienen determinadas tanto por mecanismos específicos como inespecíficos, existiendo una compleja interacción entre ambos. En general, la respuesta inmunitaria se puede dividir en dos categorías: respuesta innata y adaptativa (**Janeway, 2001**).

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa frente a los parásitos, y es aquella con la que cuenta el individuo desde su nacimiento (**De Veer et al., 2007**). Se desarrolla a través de mecanismos tanto moleculares como celulares de respuesta rápida, y se caracteriza por no establecerse respuesta de memoria (**Tizard, 2009**). En el aparato digestivo se presentan distintos mecanismos de inmunidad innata, tanto inmunológicos como no inmunológicos, que tienen como objetivo destruir al agente patógeno e impedir que se disemine por el hospedador. Entre los mecanismos no inmunológicos destacan las barreras externas físicas, químicas o biológicas que previenen la entrada del agente infeccioso o parasitario, como son el epitelio digestivo recubierto por las secreciones mucosas, el pH gástrico, las enzimas del mucus, la flora bacteriana y el peristaltismo intestinal (**Basset et al., 2003**). En el caso de que el agente patógeno supere estas barreras, entran en acción una serie de mecanismos inmunológicos, normalmente asociados a un proceso inflamatorio, en los que intervienen diversas células fagocitarias (macrófagos y neutrófilos), algunos linfocitos conocidos como Natural Killer, y diversos factores solubles, tales como los componentes de la vía alternativa del complemento, citoquinas y mediadores de la inflamación (**Collado et al., 2008; Tizard, 2009**).

La respuesta inmune adaptativa o adquirida se activa cuando los agentes patógenos han superado las primeras barreras inmunitarias. Sus respuestas son específicas y tienen la capacidad de desarrollar memoria inmunológica. Esta respuesta tarda varios días en instaurarse, tiempo necesario para reconocer al antígeno e inducir la diferenciación de los linfocitos T y B en células efectoras de memoria (**McClure et al., 2000**). Desde el punto de vista puramente teórico, la inmunidad adaptativa incluye dos tipos de mecanismos: la inmunidad celular, mediada fundamentalmente por los linfocitos T, y la inmunidad humoral, mediada por los anticuerpos. La respuesta adquirida comienza con la presentación del antígeno a los linfocitos T CD4+, los cuales regulan el tipo de respuesta efectora que se desarrollará frente al parásito (**Gómez-Lucía, 2007**). Se reconoce que este tipo celular juega un importante papel en la inmunidad de los rumiantes frente a los nematodos gastrointestinales (**Koyama et al., 1995**). Después del reconocimiento del antígeno por parte de los linfocitos T CD4+, se produce la diferenciación de las células T colaboradoras (Th), siendo un evento clave en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa, ya que la respuesta que se desarrollará frente a un patógeno invasor dependerá de las citoquinas que produzcan los linfocitos Th (**Van de Ham et al., 2013**). Durante años, diferentes estudios

realizados en roedores han mostrado que existen dos subpoblaciones de linfocitos Th, denominadas Th1 y Th2, que se distinguen por las citoquinas que producen y, en base a esto, orientan la respuesta inmune hacia mecanismos específicos frente a patógenos intracelulares (respuesta Th1) o extracelulares (respuesta Th2) **(Paul y Seder, 1994)**. Aunque en las infecciones por nematodos gastrointestinales en rumiantes nunca ha estado clara la dicotomía Th1/Th2, tradicionalmente se han considerado de mayor importancia las reacciones Th2 **(Lacroux et al., 2006)**. A partir de esta diferenciación, se ponen en marcha los mecanismos efectores de la inmunidad, entre los que destacan la hiperplasia de los mastocitos en la mucosa, la aparición o incremento del número de leucocitos globulares, el aumento de la población de eosinófilos en las mucosas, así como la hiperplasia de células productoras de mucus. En relación con esto último, suele haber un incremento de la producción de mucus y un aumento de su viscosidad, lo cual dificulta la motilidad lavaría y de los vermes adultos. Estos mecanismos efectores también incluyen el aumento de la motilidad del tracto digestivo, así como la producción de anticuerpos específicos, cuya concentración aumenta sustancialmente tanto a nivel sistémico como en el propio mucus **(Balic et al., 2000)**.

En general, en la respuesta inmune celular provocada por la infección con nematodos gastrointestinales se produce un incremento en el número de linfocitos en la mucosa y linfonódulos locales. Esta población de linfocitos puede verse incrementada o reducida dependiendo de la especie y la fase de desarrollo parasitaria, el hospedador y el tipo de infección (primaria o secundaria). En la respuesta primaria, los cambios en el número y tipo de linfocitos presentes en los tejidos y en los ganglios linfáticos regionales se producen, sobre todo, durante la fase de infección larvaria, siendo esta respuesta más rápida y pronunciada en la mucosa y linfonódulos locales de animales previamente infectados, es decir, animales sensibilizados **(Balic et al., 2000)**. Además, es frecuente observar un incremento en los recuentos de eosinófilos, tanto en la sangre como en los tejidos. Durante la infección primaria, el incremento de eosinófilos, que puede observarse tanto en los tejidos como sangre periférica, suele asociarse fundamentalmente a los estadios larvarios, probablemente debido al elevado poder quimiotáctico que ejercen las larvas de los helmintos sobre los eosinófilos **(Balic et al., 2002)**. Durante la infección secundaria, tal y como se ha descrito para los linfocitos, los recuentos de eosinófilos son, por lo general, sensiblemente superiores a los detectados en animales primoinfectados **(Balic et al., 2003)**. En la respuesta inmune celular frente a nematodos gastrointestinales también intervienen los mastocitos y leucocitos globulares. Ambos tipos celulares son capaces de liberar mediadores que favorecen la expulsión del parásito debido al ambiente hostil que se crea en el hospedador; aparte, pueden actuar como células presentadoras de antígeno, por lo que se consideran un puente entre la respuesta innata y la adaptativa **(Salinas, 2007; Metcalfe, 2008)**.

La respuesta inmune humoral va acompañada generalmente de un incremento de los niveles de anticuerpos específicos de los isotipos IgG e IgE en el suero, y de la IgA en los tejidos **(Schallig, 2000)**. Dicho aumento suele ser mayor y más rápido en infecciones secundarias **(Balic et al., 2000)**. La IgA es la inmunoglobulina más

abundante en las mucosas de los animales infectados (**Halliday et al., 2007**), asociándose más estos niveles con las etapas larvianas que con la presencia de los vermes adultos (**Canals y Gasbarre, 1990**). Sin embargo, la IgG parece relacionarse tanto con estadios larvianos como con vermes adultos, siendo una respuesta de gran magnitud tanto a nivel sistémico como local (**Wedrychowicz et al., 1994; Lacroux et al., 2006**). En su modo de acción, las IgGs podrían unirse a los antígenos parasitarios solubles, alterando con ello la actividad nutritiva y reproductora de los vermes (**Salinas, 2007**). Por su parte, la IgE parece estar relacionada con las respuestas de hipersensibilidad tipo I mediadas por mastocitos (**Claerebout y Vercruyssen, 2000**), aunque su papel en la respuesta frente a infecciones por nematodos gastrointestinales en rumiantes aún sigue siendo controvertido. En la respuesta inmune humoral también actúan determinadas citoquinas, que son proteínas producidas fundamentalmente por células del sistema inmunitario que tienen como función la comunicación entre los distintos componentes del mismo para su acción coordinada. Estas moléculas pueden ser sintetizadas por una gran variedad de células y las respuestas que inducen están en función de la célula que activen y la secuencia en la que se producen. En la actualidad se conocen una gran cantidad de citoquinas distintas, algunas de las cuales se ha demostrado que participan en la respuesta inmune frente a nematodos gastrointestinales en rumiantes, entre ellas: la interleuquina 4 (IL-4), la interleuquina 5 (IL-5), la interleuquina 10 (IL-10) o el interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (**García, 2007**).

### 3.1.2.7. Signos clínicos

La aparición de signos clínicos está relacionada con la influencia de factores dependientes del propio parásito (ciclo endógeno, hábitos alimentarios y dosis infectante), así como del hospedador (edad, receptividad, estado nutritivo, estado inmunológico), siendo la anemia, en general, el signo clínico más importante (**Dargie y Allonby, 1975; Scala, 2006**).

Otra de las alteraciones más características, tanto en infecciones por *H. contortus* como en las producidas por otros tricostrongiloideos, es la hipoproteinemia (**Abbott et al., 1988**). Son frecuentes también la anorexia y consiguiente reducción del consumo de alimento, posiblemente debido al dolor gástrico que origina la parasitación, sin que se descarte una reducción del apetito a nivel del sistema nervioso central producida por productos excretados-secretados por el parásito (**Abbott et al., 1988; Miller y Horohov, 2006**).

Comúnmente, se considera que la haemonchosis puede manifestarse siguiendo tres tipos de curso clínico: hiperagudo, agudo y crónico (**Soulsby, 1988; Urquhart et al., 2001**). La infección hiperaguda se produce en animales muy jóvenes que se exponen a una infección masiva, de en torno a 30.000 vermes. Este número de parásitos provoca el rápido desarrollo de un proceso de anemia, que suele acompañarse de heces de color oscuro y una muerte súbita debido a la pérdida de sangre (**Miller y Horohov, 2006**). El cuadro suele estar acompañado de una gastritis hemorrágica intensa y puede producir la muerte del animal, incluso durante el periodo

prepatente. La haemonchosis aguda se observa en animales jóvenes pero con infecciones menos intensas que en el caso anterior. La anemia en este caso es menor, ya que hay tiempo para que se desarrolle una respuesta eritropoyética. Las infecciones crónicas son las más comunes y, probablemente, las que tienen mayor importancia económica, debido a las pérdidas no visibles ni cuantificables que pueden ocasionar. En este caso, el número de parásitos es más bajo, pero capaz de provocar debilidad de los animales, caída de la lana de las ovejas, agotamiento y emaciación (**Scala, 2006**).

Como en otras nematodosis gastrointestinales, la haemonchosis tiene un efecto importante sobre los parámetros productivos. Se reduce la ganancia diaria de peso, el crecimiento (**Abbott et al., 1988; Bricarello et al., 2005**) y la producción de leche. Las alteraciones digestivas hacen que el organismo disponga de cantidades reducidas de proteínas, utilizándolas para funciones primarias en detrimento de otras como la ganancia de peso, producción láctea o de lana. Además, como ocurre en otras enfermedades parasitarias, las infecciones por tricostrongídeos favorecerían el desarrollo de una serie de reacciones en el hospedador que pueden traducirse en enfermedades secundarias o incluso la muerte (**Biffa et al., 2007**).

### 3.1.2.8. Lesiones

Los signos *post-mortem* observados en los animales parasitados por esta especie varían dependiendo del tipo de cuadro clínico desarrollado. En general, las membranas mucosas y la piel están pálidas, la sangre tiene un aspecto acuoso y los órganos internos están intensamente pálidos (**Nettles et al., 2002**). Con frecuencia, hay hidrotórax, fluido en el pericardio y ascitis, así como una gran caquexia y sustitución de la grasa tisular por un tejido gelatinoso de color marrón brillante, signo de degeneración. El cuajar contiene una ingesta pardo-rojiza y un gran número de gusanos que se mueven activamente si el cadáver está todavía caliente.

La mucosa aparece inflamada y cubierta de pequeñas marcas rojizas, producto de las erosiones producidas por los parásitos. A partir de los 35 días de la infección ya se observan pequeñas úlceras con hemorragias capilares. En ocasiones se detectan úlceras superficiales de bordes irregulares en las que se encuentran fijados por su extremo anterior un gran número de vermes, y no es infrecuente que se pueda llegar a producir una fuerte gastritis hemorrágica (**Urquhart et al., 2001**).

Microscópicamente, se observan alteraciones en las glándulas circundantes a aquellas afectadas por los nematodos gástricos. En ellas se produce una rápida división celular que origina una marcada hiperplasia, con engrosamiento de la mucosa, edema submucoso, así como un aumento del número de células plasmáticas (**Meana y Rojo, 2000**). También se produce una infiltración de células mononucleares en las glándulas gástricas, así como la proliferación de tejido conectivo, incluso llega a producirse necrosis (**Javanbakht et al., 2014**). En la mucosa abomasal se puede observar un aumento de linfocitos tipo T, principalmente CD4+ y  $\gamma\delta$ + en los primeros días postinfección pero, a medida que la infección avanza, este tipo de células disminuye incrementando el número de linfocitos T CD8+ (**Pérez et al., 2008**). También se ha

descrito la presencia de eosinófilos en la mucosa abomasal y en tejidos adyacentes a la infección (**González *et al.*, 2011**).

### 3.1.3. DIAGNÓSTICO

Debe realizarse en base a los datos clínicos, al historial epidemiológico, así como a distintos análisis de laboratorio.

#### 3.1.3.1. Datos clínicos y epidemiológicos

Es difícil debido a que las manifestaciones más frecuentes (adelgazamiento, anemia, etc.) pueden aparecer en otros procesos, parasitarios o no. Aun así, estos signos pueden orientar y aportan información valiosa si los relacionamos con los datos epidemiológicos.

Se puede sospechar de infecciones intensas por nematodos cuando en una explotación ganadera se aprecian signos relacionados con trastornos gastrointestinales, animales en mal estado, anoréxicos e incluso muertes esporádicas. La anemia que provoca *H. contortus*, sobre todo en animales jóvenes, puede ser un síntoma clave para el diagnóstico, aunque siempre requiere de confirmación laboratorial (**Soulsby, 1988**).

Durante los últimos años se está poniendo en práctica en zonas endémicas la utilización de métodos basados en el grado de palidez de las mucosas (FAMACHA) para estimar el grado de infección por *H. contortus*. La utilización de este método podría contribuir a identificar aquellos animales con cargas parasitarias más elevadas, con lo que se podría racionalizar el uso de antihelmínticos en términos económicos, a la vez que dificultar la aparición de resistencias debido al excesivo uso de estos productos (**van Wyk y Bath, 2002**).

#### 3.1.3.2. Análisis de laboratorio

El análisis de laboratorio es imprescindible para establecer un diagnóstico asertivo. Sin embargo, este diagnóstico debe ir acompañado de datos clínicos y epidemiológicos, puesto que ninguna prueba laboratorial de uso común tiene por sí sola un valor determinante.

Tradicionalmente, la confirmación de la infección por *H. contortus* se realiza mediante estudios coprológicos. El procedimiento más comúnmente usado para detectar huevos fecales de *H. contortus* es la técnica de concentración por flotación, que se basa en la capacidad de los huevos del parásito para flotar en soluciones concentradas de azúcar, cloruro sódico, sulfato de zinc, sulfato magnésico o nitrito de sodio. La morfología de los huevos de *H. contortus* es similar a la de otros géneros de la misma familia Trichostrongylidae (*Ostertagia spp.*, *Trichostrongylus spp.*, etc.) por lo que un diagnóstico certero debe ir precedido de cultivos fecales y observación de las características morfológicas de las L3 (**Meana y Rojo, 2000**). En ocasiones, es necesario

realizar un análisis cuantitativo de las muestras fecales, como indicador de la carga parasitaria. Para ello se han descrito varios procedimientos, como la técnica de la doble centrifugación, el método de Stoll modificado y la técnica de McMaster, siendo esta última la más usada (**MAFF, 1989; Ballweber, 2006**).

### 3.1.3.3. Necropsia

Este método de diagnóstico incluye el estudio tanto de las lesiones generales (anemia, ascitis, adelgazamiento, caquexia) como de las locales (gastritis), incluyendo la visualización de los vermes adultos en el cuajar. Es una forma de diagnóstico sencilla, pero también tiene sus inconvenientes; por ejemplo, cuando no se encuentran vermes en el abomaso de los animales como consecuencia de un fenómeno de autocura o cuando, en la fase terminal de la enfermedad, la mayor parte de los parásitos han desaparecido del abomaso (**Urquhart et al., 2001**). En otros casos, la muerte puede sobrevenir en ausencia de un número abundante de vermes en la luz del abomaso debido a la acción patógena ejercida por los vermes inmaduros (**Miller y Horohov, 2006**).

### 3.1.3.4. Diagnóstico serológico

Otros métodos que se han considerado en el diagnóstico de la haemonchosis y otras parasitosis gastrointestinales han sido distintos métodos serológicos, entre los que cabría destacar algunos test inmunoenzimáticos (ELISA), tanto para detectar reacciones serológicas frente a antígenos somáticos como frente a productos de excreción/secreción de *H. contortus* (**Prasad et al., 2008**), bien en forma de antígenos circulantes (en muestras de suero, orina o leche) (**Petit et al., 1981**) o, incluso, como coproantígenos (**Derbala y el-Rahman, 2001**). Entre los inconvenientes observados en su utilización se han señalado la dificultad para detectar infecciones primarias (**Gill, 1991**), o la aparición de reacciones cruzadas con otros tricostrongílidos (**Cuquerella et al., 1994**). Para evitar las reacciones cruzadas (especialmente frente a *Teladorsagia circumcincta*), se han llevado a cabo distintos estudios en los que se ha analizado la respuesta serológica frente antígenos específicos de vermes adultos o larvas 4 de *H. contortus*, tanto en ganado ovino (**Schallig et al., 1994; Gómez-Muñoz et al., 2000**) como en caprino (**Molina et al., 1999**).

### 3.1.3.5. Otros métodos

Algunos autores han conseguido diferenciar la presencia de huevos fecales de *H. contortus* de diversos tricostrongílidos mediante la utilización de algunas lectinas como marcadores. Así, la aglutinina de cacahuete se ha observado que se une de forma específica a la superficie de los huevos de *H. contortus* (**Palmer y McCombe 1996**). También se han demostrado de utilidad la determinación de sangre oculta en las heces (**Colditz y Le Jambre, 2008**) y la PCR en tiempo real (**Siedek et al., 2006**).

### 3.1.4. TRATAMIENTO, PROFILAXIS Y CONTROL

#### 3.1.4.1. Antihelmínticos sintéticos

Actualmente, el control y la profilaxis de las trichostrongiloidosis incluyen un conjunto de acciones que combinan los tratamientos antihelmínticos estratégicos con prácticas de pastoreo que limiten los riesgos de infección. Estas medidas deberían diseñarse de forma específica de acuerdo con los sistemas de explotación y las condiciones climáticas **(Meana y Rojo, 2000)**.

Entre los fármacos que se emplean actualmente destacan los pertenecientes a los siguientes grupos farmacológicos: benzimidazoles y probenzimidazoles (como el febendazol y el albendazol), imidazotiazoles (como el tetramisol y el levamisol) y lactonas macrocíclicas (como la ivermectina, la doramectina o la eprinomectina), todos ellos ampliamente empleados **(Schoenian, 2005)**. Sin embargo, la utilización reiterada y de forma inadecuada de estos fármacos ha favorecido el desarrollo de cepas de nematodos gastrointestinales resistentes frente a estos fármacos en todo el mundo **(Wolstenholme et al., 2004)**, lo que está empezando a complicar su control.

Como se ha comentado anteriormente, es necesario tomar medidas complementarias y/o alternativas al uso de antihelmínticos; a continuación se describen brevemente algunos de los métodos más comúnmente utilizados.

#### 3.1.4.2. Manejo del pasto

Se considera de gran importancia la adaptación del tipo de manejo del pasto a las condiciones climáticas de la zona o región, puesto que cada parásito se adapta a las condiciones locales. El objetivo principal de la mayoría de los actuales regímenes de pastoreo consiste en aumentar al máximo la utilización de los pastos disponibles para el ganado de pastoreo, a la vez que disminuir la cantidad de larvas infectantes (L3) en el pasto para, en definitiva, limitar el contacto entre hospedadores y parásitos **(Stear et al., 2007)**. Otra posibilidad podría ser la disminución de la densidad del rebaño, puesto que un menor número de hospedadores permitiría una menor eliminación de huevos en el pasto y con ello disminuiría la posibilidad del contagio para otros animales **(Soulsby, 1988; Stromberg, 1997)**.

#### 3.1.4.3. Suplementos nutricionales

La alimentación suplementaria se considera también un método de control frente a nematodos, aunque la adopción más generalizada de esta solución no es sencilla debido, principalmente, al coste del mismo **(Stear et al., 2007)**.

Un ejemplo de este tipo de actuación sería el suplemento de proteínas en la dieta antes y durante la infección **(Nnadi et al., 2007)**. Este procedimiento podría ayudar a prevenir o reducir los signos clínicos en infecciones por *H. contortus*, además de favorecer el desarrollo de una respuesta inmune efectiva frente al parásito **(Wallace et al., 1999; Strain y Stear, 2001)**.

Así mismo, algunos estudios han demostrado que la dieta suplementada con urea en corderos infectados con *H. contortus* es capaz de elevar los niveles de albúmina plasmáticos y el hematocrito, así como producir un aumento en la ganancia media diaria de peso y de apetito de los animales (**Wallace et al., 1998**).

Además del efecto positivo de las dietas con suplementos proteicos, se ha observado que ciertos oligoelementos como el hierro, el zinc, el cobre o el molibdeno podrían actuar reforzando la resistencia del hospedador a las infecciones por nematodos, por lo que su empleo podría incluirse también entre las estrategias de control de las nematodosis gastrointestinales (**Koski y Scott, 2003**). Otros autores han demostrado que añadir selenio a la alimentación de los animales podría mejorar la respuesta inmune frente a diferentes patógenos, incluyendo las infecciones por *H. contortus* en ovejas (**Hooper et al., 2014**).

A parte de los métodos anteriormente citados, existen nuevas alternativas al tratamiento y control de las parasitosis, como el control inmunológico, la selección de razas resistentes, el control biológico o la fitoterapia. Estos serán descritos con más detalle en los siguientes apartados.

## 3.2. COCCIDIOSIS

### 3.2.1. INTRODUCCIÓN

Las parasitosis producidas por las diferentes especies del género *Eimeria* en los pequeños rumiantes constituyen un grupo de enfermedades denominadas comúnmente coccidiosis. Los coccidios se transmiten por contaminación orofecal y se reproducen mediante secuencias de fases sexuales y asexuales de multiplicación y desarrollo, principalmente en las células epiteliales del canal alimentario; como resultado se produce una enteritis que puede variar de catarral a hemorrágica y que suele acompañarse de diversos grados de diarrea, pérdida de peso, anorexia, mal estado general y, en ocasiones, muerte (**Bowman, 2004**).

### 3.2.2. ETIOLOGÍA

#### 3.2.2.1. Taxonomía

La clasificación taxonómica de las especies responsables de las coccidiosis parasitarias en rumiantes más aceptada actualmente es la siguiente (Schneider, 1975; Soulsby, 1982; Levine, 1988; Urquhart *et al.*, 1996):

**PHYLUM:** Apicomplexa

**CLASE:** Sporozoa

**SUBCLASE:** Coccidia

**ORDEN:** Eucoccidia

**SUBORDEN:** Eimeriina

**FAMILIA:** Eimeridae

**GÉNERO:** *Eimeria*

Hasta la fecha se han descrito un total de 18 especies de *Eimeria* en los caprinos (**Soe y Pomroy, 1992; Smith y Sherman, 2009**), de las cuales nueve se reconocen como las más frecuentes y de mayor trascendencia patológica, considerándose *Eimeria arloingi* (Marotel, 1905), *Eimeria ninakohlyakimovae* (Yakimoff y Rastegaieff, 1930) y *E. christenseni* (Lima, 1961) como las más patógenas, debido a su capacidad de replicación masiva durante la primera merogonia en las células endoteliales hospedadoras, y a la destrucción generalizada de la mucosa intestinal afectada (**Soe y Pomroy, 1992; Ruiz et al., 2006; Taylor et al., 2007**). Otras especies de *Eimeria* que se encuentran presentes en el ganado caprino son *E. alijeivi* (Kasim et al., 1991; Musaev, 1970), *E. hirci* (Lima, 1980), *E. caprina* (Lima, 1999), *E. caprovina* (Lima, 1980) y *E. jolchijevi* (Lima, 1980). Todas estas últimas especies se desarrollan en las células epiteliales del intestino delgado y grueso y, por lo general, se consideran

menos patógenas que las anteriores, aunque se han descrito casos de coccidiosis subclínicas atribuidos a algunas de ellas (**Taylor et al., 2007**).

### 3.2.2.2. Morfología

Las especies del género *Eimeria*, al igual que ocurre en otros coccidios, presenta en su desarrollo biológico un tipo morfológico denominado zoíto, que es una célula móvil, con forma de plátano, redondeada por un extremo y puntiaguda por el otro. Según el momento del ciclo biológico de los coccidios, los zoítos reciben diferentes denominaciones, entre ellas esporozoítos (formas infectantes que se encuentran en los ooquistes esporulados) y merozoítos (formas resultantes de la multiplicación asexual del parásito dentro del hospedador) (**Jolley y Bardsley, 2006**). Todos ellos tienen en común la presencia de un complejo apical que está formado por elementos estructurales y secretores que son cruciales en el proceso activo de invasión de la célula hospedadora, en el proceso de formación de la vacuola parasitaria y en la división celular dentro de la células hospedadoras infectadas (**Morrisette y Silbley, 2002; Striepen et al., 2007; Katris et al., 2014**). Entre los componentes estructurales del complejo apical se encuentra un anillo-polar, un conoide, microtúbulos subpeliculares, roptrias, micronemas y gránulos densos, algunos de los cuales juegan un papel también en la organización de los microtúbulos de la célula hospedadora durante el crecimiento intracelular y la replicación de parásito (**Chobotar y Scholtyseck, 1982; Urquhart et al., 1996**). Los elementos estructurales del complejo apical proporcionan la orientación del parásito, y son el punto focal para la externalización de sus orgánulos secretores (**Katris et al., 2014**). Por otra parte, después del contacto del complejo apical con la membrana de la célula hospedadora, la invasión celular se logra debido a que el parásito activa la motilidad y/o desplazamiento regulado por elementos de actina y miosina (**Striepen et al., 2007**).

Todas las especies de la Familia Eimeridae forman ooquistes que son eliminados al medio por las heces como formas de resistencia. La morfología de los ooquistes es clave para la diferenciación entre las distintas especies, pudiendo variar entre redondeada, ovoide o elipsoide. Otras características morfológicas, tales como la presencia o no del micrópilo (estrechamiento de la pared de algunos ooquistes en uno de sus extremos), o la cápsula micropilar (estructura en forma de casquete que puede estar recubriendo el micrópilo), así como el color de la pared o el tiempo de esporulación de los ooquistes también se emplean en la diferenciación entre especies (**Eckert et al., 1995**).

El ooquiste de *E. ninakohlyakimovae* tiene forma subsférica o ligeramente elipsoide y su tamaño oscila entre los 20-28 x 15-22  $\mu\text{m}$ . No tiene casquete polar y el micrópilo falta frecuentemente. En esta especie, la esporulación ocurre entre 24-48 horas a temperatura ambiente, una vez que los ooquistes han sido eliminados por las heces (**Soe y Pomroy, 1992; Koudela y Bokóva, 1998**). Los ooquistes presentan cuerpo de Stiedae, y en el interior del quiste esporulado, resultado del proceso de esporulación, pueden apreciarse cuerpos residuales y gránulos polares (**Ruiz et al., 2013**).

Durante el desarrollo endógeno de *E. ninakohlyakimovae*, se producen dos generaciones de esquizontes, dando lugar la primera de ellas a la formación de esquizontes de gran tamaño o macrosquizontes, los cuales presentan un tamaño aproximado de 166µm x 124 µm y pueden contener hasta 100.000 merozoítos de primera generación. Los esquizontes de segunda generación de esta especie son mucho más pequeños que los primeros, siendo su dimensión de 17 µm x 12 µm aproximadamente (**Vieira et al., 1997**).

### 3.2.2.3. Ciclo biológico

La forma general del ciclo de vida de los coccidios está bien representada por el género *Eimeria*, cuyas especies, incluyendo *E. ninakohlyakimovae*, son parásitos gastrointestinales de un amplio grupo de hospedadores, en este caso el ganado caprino. Este ciclo vital incluye tanto fases de multiplicación sexual como asexual (**Fig. 2**).

#### *Esquizogonia (merogonia, ciclo asexual)*

Cuando el ooquiste esporulado es ingerido por un hospedador adecuado, se produce la exquistación en la luz intestinal, liberándose los 8 esporozoítos que contiene en su interior. Los esporozoítos migran hasta infectar células intestinales específicas, células endoteliales de los capilares linfáticos centrales de las vellosidades del íleon distal y yeyuno en el caso de *E. ninakohlyakimovae* (**Vieira et al., 1997**). Tras la infección, el esporozoíto adquiere una forma redondeada y ligeramente de mayor tamaño conocida como trofozoíto. En la misma célula, el trofozoíto crece y se convierte en un esquizonte (o meronte) de primera generación, resultado de un proceso de reproducción asexual. En *E. ninakohlyakimovae*, estos esquizontes se desarrollan aproximadamente a los 10-12 días post-infección (**Vieira et al., 1997**). El esquizonte formado generará merozoítos de primera generación que hacen estallar la célula para invadir otras y transformarse en esquizontes de segunda generación, aunque en algunas especies la merogonia puede repetirse, incluso, en más ocasiones. Estas repeticiones de ciclo asexual del parásito son mucho más rápidas que la primera merogonia y suelen tener lugar en el epitelio del íleon, ciego y colon en torno al día 13 post-infección (**Mehlhorn, 2004; Uquhart et al., 1996**).

Los atributos más destacados de la esquizogonia son: el crecimiento exponencial del número de merozoítos obtenidos a partir de un único esporozoíto, la destrucción de las células hospedadoras, proporcional al grado de infección, y la detención automática del proceso asexual después de un número determinado de repeticiones.

#### *Gametogonia (ciclo sexual)*

Los merozoítos producidos en última esquizogonia entran en nuevas células epiteliales para desarrollar gametocitos machos (microgameto) y hembras

(macrogameto). La fusión de ambos da lugar a un cigoto diploide que, inmediatamente, sufre una meiosis para volver a establecer formas haploides, el denominado esporogonio u ooquiste no esporulado, que será eliminado al medio en las heces de los animales infectados, completándose así el ciclo de vida endógeno del parásito (Striepen *et al.*, 2007). La formación de los gamontes de *E. ninakohlyakimovae* tiene lugar en las células epiteliales de las criptas del ciego y colon, siendo común observar células infectadas por más de un gameto. El mayor porcentaje de microgametos se localiza en el ciego, mientras que los macrogametos se sitúan en las células del colon de los animales infectados. Los primeros ooquistes comienzan a formarse a partir del día 13 postinfección, comenzando la liberación en heces en torno a los días 14-15 post-infección (Viera *et al.*, 1997; Ruiz *et al.*, 2013).

### Esporogonia

Al cabo 24-48 horas, si el ooquiste dispone de humedad y temperatura adecuadas, y del oxígeno suficiente, la única célula (esporonte) que hay en su interior se divide en cuatro esporoblastos. Cada uno de los esporoblastos terminará desarrollando un esporocisto que contiene dos esporozoítos en su interior, transformándose así en un ooquiste esporulado infectante y completándose de este modo el ciclo biológico (Uquhart *et al.*, 1996; Bowman, 2004).



Figura 2. Ciclo biológico de *Eimeria ninakohlyakimovae*

### 3.2.2.4. Epidemiología

*E. ninakohlyakimovae* es un parásito de distribución mundial que afecta fundamentalmente a los caprinos (Soe y Pomroy, 1992; Jalila *et al.*, 1998; Koudela y Bokóva, 1998; Ruiz *et al.*, 2006), aunque referencias bibliográficas menos recientes también citan como hospedadores a ovejas, carneros de las Montañas rocosas, muflón, ciervo rojo y corzos (Soulsby, 1988). Esta especie tiene una alta prevalencia en Gran Canaria, tal y como se describe en un estudio realizado por Ruiz *et al.* (2006). En dicho estudio se encontró *E. ninakohlyakimovae* en el 30 % de los animales muestreados, con un mismo porcentaje en animales adultos y jóvenes. En este mismo

trabajo se observaron porcentajes variables de otras especies de *Eimeria*, entre ellas *E. arloingi*, *E. alijevi* (las más frecuentes además de *E. ninakohlyakimovae*), *E. caprina* y *E. caprovina*, entre otras. También se ha encontrado a *E. ninakohlyakimovae* en países como La República Checa, en esta ocasión con una frecuencia del 56 % (**Koudela y Bokóva, 1998**), Sri Lanka o Malasia (**Faizal et al., 2001; Jalila et al., 1998**). Otros autores han descrito la presencia de este parásito en diferentes porcentajes en varias regiones del mundo. Así se encontraron infectadas el 31 % de las cabras en Kazakstán y un porcentaje menor en Alemania y USA (**Soulsby, 1988**). Finalmente, en Zimbabue, junto a *E. alijevi*, se encontró parasitando al 99 % de los animales muestreados en un estudio realizado por **Chhabra et al. (1991)**.

Hay muchos factores que influyen en la distribución y presencia de *E. ninakohlyakimovae* y el resto de especie de *Eimeria*, en general, destacando entre ellos el tipo o sistema de explotación. En el pastoreo extensivo, la diseminación de los animales y la dilución enorme de los ooquistes en amplias superficies motivan que la posibilidad de contaminaciones intensas sea muy baja. En cambio, la estabulación, con superpoblación, sea para proteger del clima frío, sea para separar los cabritos para el mercado, es un factor de riesgo (**Harper y Penzhorn, 1999**). Otro factor a tener en cuenta es el clima y las condiciones ambientales de temperatura y humedad. Aunque la escasa humedad limita la presencia del parásito, se ha observado que los ooquistes son capaces de sobrevivir en zonas áridas o semiáridas (**Ruiz et al., 2006**).

Otro factor que determina la presencia del parásito es la edad del animal. Al igual que otras especies de *Eimeria*, *E. ninakohlyakimovae* afecta con mayor prevalencia a animales jóvenes, especialmente a cabritos de entre 3-4 semanas y 4 meses de edad, los cuales pueden eliminar hasta un millón de ooquistes por gramo de heces en infecciones intensas (**Ruiz et al., 2006**). Por el contrario, en animales mayores de 4 años los recuentos de ooquistes por gramo de heces son mucho menores (**de la Fuente et al., 1992**). En animales adultos, al igual que en los jóvenes, son frecuentes las infecciones mixtas (**Koudela y Bokóva, 1998**).

Algunos autores han relacionado el desarrollo de la coccidiosis con la higiene de la explotación, observándose recuentos de ooquistes por gramo de heces menores en explotaciones con buena o moderada higiene, y mayores en granjas con poca higiene (**Hidalgo y Cordero del Campillo, 2000**).

En general, la incidencia estacional de la coccidiosis está determinada por la disponibilidad de los animales jóvenes para el desarrollo del parásito, por la supervivencia de los ooquistes de una estación a la próxima, y por la eliminación de ooquistes durante el periodo de postparto (**Soulsby, 1988**).

### 3.2.2.5. Patogénesis

Las cabras son muy sensibles a las infecciones por *Eimeria*, por lo que la coccidiosis se considera un problema serio en los sistemas de producción caprina en todo el mundo. La principal acción patógena de *E. ninakohlyakimovae* es la destrucción de las células epiteliales del intestino como resultado de las fases de reproducción

endógena, tanto asexual como sexual. El parásito invade las células del intestino delgado, ciego y colon produciendo descamación del epitelio y atrofia de las vellosidades. Como consecuencia se produce un síndrome de malabsorción y pérdida de fluidos, que se asocian con deshidratación y diversos grados de diarrea. La diarrea también está asociada con una reducción de la fosfatasa alcalina y un incremento del hematocrito y la hemoglobina (**Dai et al., 2006**).

### 3.2.2.6. Respuesta inmune frente a coccidios

Al igual que en las nematodosis gastrointestinales, la respuesta inmunitaria en la coccidios se divide en respuesta innata y adquirida. La respuesta innata del hospedador frente a las infecciones por *Eimeria* en rumiantes es relativamente desconocida. Las barreras físicas (p.e. la mucosa), las células epiteliales, las células endoteliales y los leucocitos, componen las líneas de defensa de especificidad creciente que forman parte del sistema inmunitario innato. Entre estos componentes, se ha observado que el endotelio puede jugar un papel importante en la respuesta inmune innata frente a infecciones por algunas especies de *Eimeria* en las que las células endoteliales actúan como células hospedadoras, entre ellas: *E. bovis* (bovinos), *E. ninakohlyakimovae*, *E. arloingi* y *E. christensenii* (caprinos) y *E. bakubensis* (ovinos). Ante la infección y posterior desarrollo del parásito, las células endoteliales pueden responder modulando la transcripción génica de moléculas inmunorreguladoras de la respuesta inmune, incluyendo citoquinas, quimiotinas y moléculas de adhesión. Este hecho se ha demostrado en infecciones *in vitro* de BUVEC (bovine umbilical vein endotelial cells) con esporozoítos de *E. bovis*, las cuales muestran un aumento de la transcripción de genes que modifican moléculas proinflamatorias e inmunorreguladoras (**Taubert et al., 2006**). Una respuesta similar se ha observado también en infecciones *in vitro* de CUVEC (caprine umbilical vein endotelial cells) con esporozoítos de *E. ninakohlyakimovae*, encontrándose incrementadas en este caso las moléculas inmunorreguladoras E-selectina, TNF- $\alpha$ , CCL2 y GM-CSF (**Pérez et al., 2015a**). Como se comentó anteriormente, no sólo las barreras físicas actúan en la respuesta inmune innata, sino que también lo hacen los leucocitos inmunocompetentes innatos, entre ellos los polimorfonucleares neutrófilos (PMN), los monocitos, los macrófagos, las células dendríticas, las células asesinas naturales (NK), los eosinófilos, los monocitos y los leucocitos globulares. Los PMN juegan un papel muy importante en la inmunidad innata ya que, aparte de ser los leucocitos más abundantes (comprenden entre el 50 y el 80 % del total de glóbulos blancos), constituyen la primera línea de defensa frente a los agentes patógenos, siendo los primeros leucocitos en ser reclutados hacia el sitio de la infección (**Hahn et al., 2013**). En las especies de *Eimeria* que afectan a mamíferos superiores, especialmente durante el proceso de invasión celular, los esporozoítos están expuestos a esas células, lo cual podría constituir una importante oportunidad del sistema inmune innato temprano para eliminar o reducir el nivel de infección (**Abi Abdallah y Denkers, 2012**). Así, se ha

demostrado que los PMN interactúan directamente con los esporozoítos y antígenos de *E. bovis*, bien eliminado directamente al parásito o bien mediante la producción de citoquinas y quimioquinas (Behrendt *et al.*, 2008), observándose esta interacción, incluso, en cultivos *in vitro* de células endoteliales (Hermosilla *et al.*, 2006). Por su parte, en infecciones experimentales con *E. ninakohlyakimovae* en cabritos se han descrito leves alteraciones en los recuentos periféricos de PMN, así como un incremento de los mismos en la mucosa del íleon y colon (Ruiz *et al.*, 2013). En modelos *in vitro* también se ha observado una interacción entre PMN caprinos y esporozoítos de *E. ninakohlyakimovae*, que se ha visto traducida en una inducción en la producción de varias citoquinas y quimioquinas inmunorreguladoras relevantes en la respuesta inmune innata como la IL-12 y el TNF- $\alpha$  (Pérez *et al.*, 2015b). El papel de los monocitos o macrófagos frente a parásitos del género *Eimeria* es menos conocido, aunque existen evidencias de que ambos tipos celulares son capaces de provocar la degeneración de macroesquizontes tanto en animales infectados con *E. bovis* como en cultivos *in vitro* de monocitos (Friend y Stockdale, 1980; Hughes *et al.*, 1987). También se ha demostrado que los monocitos bovinos aumentan su actividad oxidativa y fagocítica en presencia de esporozoítos libres de *E. bovis*, así como la producción de citoquinas y quimioquinas cuando son infectados con merozoítos I (Taubert *et al.*, 2009). Un incremento en la producción de ciertas citoquinas y quimioquinas se ha observado, igualmente, en infecciones de monocitos caprinos con diferentes estadios de *E. ninakohlyakimovae* (Pérez *et al.*, 2015c). También se ha señalado la importancia de los mastocitos, los leucocitos globulares y las células NK en la respuesta inmune innata frente a coccidios, principalmente en aves, donde se ha demostrado un incremento en el número y actividad de estas células después de la infección por distintas especies del género *Eimeria* (Lillehoj y Bacon, 1991; Morris *et al.*, 2004). En este mismo sentido, en cabritos primo-infectados con *E. ninakohlyakimovae* y sacrificados durante el periodo prepatente desarrollaron un incremento de los mastocitos (Matos *et al.*, 2011). Algunos de estos tipos celulares, como es el caso de la células dendríticas (Reis y Souza, 2004), pueden incluso jugar un papel importante enlazando la inmunidad innata y la adaptativa, siendo capaces de liberar citoquinas como IL-2, IL-6 o TNF cuando son estimuladas por antígenos proteicos de protozoos intestinales como *Eimeria* (Rosenberg *et al.*, 2005). Además de todas las funciones ya conocidas por las células responsables de la inmunidad innata, recientemente, se ha descubierto un nuevo mecanismo de acción frente a parásitos protozoos del phylum Apicomplexa que afectan a rumiantes, como por ejemplo *E. bovis*, *Besnoitia besnoti*, *E. arloingi* y *E. ninakohlyakimovae*. Este mecanismo consiste en la formación de trampas extracelulares derivadas de diversos tipos celulares (entre ellos PMN, monocitos y macrófagos) que son capaces de mediar la muerte o la inmovilización extracelular del parásito (Baker *et al.*, 2008; Muñoz-Caro *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014, Pérez *et al.*, 2015b y 2015c). Las estructuras denominadas “extracelular traps” (ETs) están compuestas por redes de ADN mitocondrial y proteínas celulares en un 70 %, principalmente histonas, enzimas granulares microbicidas y péptidos (Brinkmann *et*

*al.*, 2004; 2012). La concentración de todos los componentes de la red proporciona una matriz extracelular capaz no sólo de atrapar, sino también de matar a los agentes patógenos invasores, con la ventaja de reducir al mínimo los daños en los tejidos circundantes (Logters *et al.*, 2009; Hahn *et al.*, 2013). Durante la formación de las ETs parece necesario que tengan que ocurrir varios sucesos nucleares y citoplasmáticos con el fin de iniciar una completa y adecuada extrusión de la red. El proceso se inicia cuando las células inmunes innatas se activan tras el contacto con los diferentes agentes patógenos. Posteriormente, se produce una serie de cambios morfológicos, como la degradación de la envoltura nuclear, la descondensación de la cromatina y la degradación de las membranas de los gránulos (Fuchs *et al.*, 2007). A continuación, el contenido nuclear se mezcla con el contenido granular citoplasmático y, finalmente, se produce la extrusión extracelular de la mezcla de proteínas nucleares y granulares acompañadas de histonas debido a una contracción del citoesqueleto (Brinkmann *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2009; Abi Abdallah y Denkers, 2012; Hanh *et al.*, 2013; Hermosilla *et al.*, 2014).

Sin restar importancia a la respuesta inmune innata, la respuesta inmune adquirida constituye un componente esencial frente a las infecciones por coccidios del género *Eimeria* en rumiantes. De este modo, se ha demostrado en repetidas ocasiones que en las reinfecciones por coccidios es menos probable que se desencadene una enfermedad clínica, lo que confirma la importancia de la exposición anterior durante las infecciones primarias en el resultado de la inmunidad protectora (Daugochies y Najdrowski, 2005). En general, las respuestas celulares y humorales que forman parte de la respuesta inmunitaria adaptativa frente a la coccidiosis intestinal en rumiantes se desarrollan rápidamente tras el primer contacto con el antígeno y su intensidad depende del número de ooquistes ingeridos (Daugochies y Najdrowski, 2005). Muchos estudios indican y confirman el importante papel que juega en la inmunidad los linfocitos tipo T en la infección primaria por coccidios, por ejemplo en las reinfecciones por *Eimeria spp.* y *Toxoplasma*. En concreto, la respuesta mediada por células T se ha asociado con una menor excreción de ooquistes en animales re infectados con *E. bovis* (Hermosilla *et al.*, 1999; Taubert *et al.*, 2008; Sühwold *et al.*, 2010), estando implicados en ella los linfocitos CD4+ y CD8+, fundamentalmente (Hermosilla *et al.*, 1999). En particular, las infecciones por coccidios de rumiantes como *E. ninakohlyakimovae* o *E. bovis*, que invaden células endoteliales, pueden desarrollar reacciones inmunes que implican un gran número de células inmunoeractivas. Así, las infecciones por *E. bovis* en el ganado bovino inducen una red de regulación molecular asociada al movimiento y tráfico de leucocitos al lugar de la infección y, como resultado, se produce una fuerte reacción inflamatoria (Taubert *et al.*, 2010). Esta reacción coincide en el tiempo con la proliferación de células T en los terneros infectados, así como con la aparición de antígenos específicos del parásito en la superficie de las células endoteliales parasitadas (Badaway *et al.*, 2009). Además de la activación de las células T, esta red atrae a células de la respuesta innata, como

macrófagos y polimorfonucleares (**Behrendt et al., 2010**). Finalmente, en la respuesta inmune celular adquirida también se ha observado un importante papel de los eosinófilos. Así, en infecciones por *E. ninakohlyakimovae* se han encontrado recuentos significativamente elevados de eosinófilos en el periodo prepatente de la infección en la mucosa del íleon en cabritos reinfectados experimentalmente con este parásito (**Matos et al., 2011**), hallazgo que puede ser debido a un complejo entramado de regulación de la migración de los eosinófilos hacia los tejidos por mediadores como la citoquina IL-5, distintas quimioquinas u otros mediadores solubles como el factor de complemento C5a (**Jonh et al., 2005; Nussbaum et al., 2013**).

A parte de la respuesta celular, en la inmunidad adquirida frente a las infecciones por *Eimeria*, cada vez son más los estudios que destacan la importancia de la respuesta humoral. Este tipo de respuesta se desarrolla rápidamente y se caracteriza por la aparición de un título alto de anticuerpos en el suero del animal infectado, con un incremento inicial de IgM, seguido por IgG; también pueden aparecer otras inmunoglobulinas específicas como la IgA y, en general, la cantidad de anticuerpos va aumentando si los animales están continuamente expuestos a los ooquistes (**Faber et al., 2002**). Se ha demostrado que la respuesta inmune humoral desempeña un papel importante en las reinfección por coccidios en rumiantes. Este hecho se comprobó en infecciones experimentales con *E. ovinoidalis* y *E. faurei* en ovejas, donde la presencia de anticuerpos específicos se demostró tanto en las infecciones primarias como en las secundarias (**Nolan et al., 1987**). No obstante, estos mismos autores destacaron que la respuesta humoral, por sí sola, no provocaba una inmunoprotección absoluta.

### 3.2.2.7. Signos clínicos

La severidad de los signos depende de la intensidad de la infección inicial. Los primeros signos aparecen al cabo de 2 o 3 semanas después de una infección intensa. Normalmente, hay una diarrea más o menos marcada cuyo color oscila entre amarillento y verde marronacéo, con o sin estrías de sangre. También se puede apreciar un retraso general del crecimiento en los animales, depresión, pérdida de apetito y adelgazamiento. La diarrea con eliminación de heces muy líquidas, sin mucus ni sangre, puede persistir varios días, incluso durante la prepatencia (**Koudela y Bokóva, 1998**). El periodo de patencia puede llegar a dos semanas y causar la muerte de los animales infectados por deshidratación. Los animales se debilitan, sufren ataxia y pueden llegar a no ponerse en pie (**Hidalgo y Cordero del Campillo, 2000**). Aquellos que experimentan una primoinfección intensa con especies que desarrollan gametogonia en el intestino grueso, como *E. ninakohlyakimovae*, acompañando a todos los síntomas citados anteriormente se puede observar una severa diarrea líquida, a veces hemorrágica, capaz de arrastrar porciones de mucosa intestinal (**Foreyt, 1990; Ruiz et al., 2013**). Si los animales no mueren en 7-10 días, se recuperan lentamente. En ciertas condiciones, la coccidiosis puede estar asociada a mortalidad súbita sin precedentes de signos clínicos, en especial en animales jóvenes de entre 2 y 4 meses de edad (**Chartier et al., 1994**).

Por todo ello, la coccidiosis se considera una enfermedad de gran importancia económica en los sistemas de producción caprina en todo el mundo, ya que causa efectos negativos en el bienestar de los animales y en el rendimiento de la producción, incluso cuando los signos clínicos típicos de esta enfermedad no son perfectamente visibles (**Daugschies y Najdrowski, 2005**).

### 3.2.2.8. Lesiones

Las lesiones varían con la especie implicada. De forma general, se observa que la zona perianal del animal se encuentra sucia por las deyecciones diarreicas, que pueden ser más o menos líquidas y de un color variable, desde amarillo hasta rojizo (**Mundt et al., 2005**).

En la necropsia se puede ver que el intestino delgado aparece dilatado, congestivo y con la mucosa inflamada, frecuentemente con hemorragias y exceso de mucus. Los macroesquizontes pueden apreciarse a simple vista como placas amarillas o blanquecinas en forma de nódulos elevados e irregulares, especialmente en el yeyuno y en el íleon (**Koudela y Bokóva, 1998; Daugschies y Najdrowski, 2005**).

Histológicamente, se puede observar descamación y necrosis del revestimiento, destrucción celular en las criptas y, más tarde, proliferación celular de las mismas. Las vellosidades pierden su estructura, observándose congestión y hemorragias capilares. Como consecuencia de la respuesta inflamatoria se produce una infiltración celular, en la que predominan linfocitos, polimorfonucleares neutrófilos y eosinófilos. Acompañando a esta infiltración se suelen encontrar diversas formas del ciclo parasitario: esquizontes, gametocitos y ooquistes (**Taylor et al., 2003**). También se puede observar hiperplasia en los nódulos mesentéricos, colecistitis en la vesícula biliar y degeneración focal y necrosis en el hígado (**Dai et al., 2006**).

Cuando la infección es producida por *E. ninakohlyakimovae* la mucosa intestinal puede mostrar hemorragias petequiales y la pared está inflamada y engrosada, tal y como se ha descrito anteriormente de forma general (**Soulsby, 1988**). Igualmente, en el estudio histopatológico se puede observar atrofia de las vellosidades intestinales en el intestino delgado, moderada hiperplasia en el epitelio intestinal y enteritis caracterizada por infiltración multifocal de linfocitos en el intestino delgado y grueso, como corresponde a la lesión inflamatoria asociada a la parasitación. En los casos de muerte súbita se observa una marcada invasión de neutrófilos y eosinófilos, mientras que la presencia de macrófagos y linfocitos se hace evidente en animales que mueren varios días después de la aparición de los signos clínicos (**Ruiz et al., 2013; Razavi et al., 2014**). Los cortes histopatológicos de diferentes secciones del intestino de cabritos parasitados por *E. ninakohlyakimovae* muestran hiperplasia en el epitelio así como hipertrofia de los nódulos mesentéricos y Placas de Peyer. También se ha descrito la presencia de eosinófilos acompañado de una infiltración celular difusa compuesta por monocitos, eosinófilos, linfocitos y polimorfonucleares. Además, es frecuente observar en el intestino delgado las formas sexuales de parásito así como ooquistes, inmaduros y maduros (**Ruiz et al., 2013**).

### 3.2.3. DIAGNÓSTICO

Ninguna de las manifestaciones clínicas de la enfermedad es patognomónica, de manera que, para llevar a cabo un adecuado diagnóstico, deben valorarse conjuntamente los resultados de la anamnesis, datos clínicos, los análisis coprológicos y la necropsia, además de la evidencia de las condiciones higiénicas, tanto en la cría extensiva como en la intensiva. En el mismo sentido, ha de considerarse la situación general del ganado, más que analizar al individuo aislado.

Puede sospecharse de coccidiosis, en ausencia de helmintosis, cuando hay diarreas en cabritos de 4-6 semanas, o en los de 3-5 meses concentrados en instalaciones de cebo, si van acompañadas de eliminación de grandes cantidades de ooquistes, generalmente con predominio de 3 o 4 especies diferentes de *Eimeria*. No obstante, ha de tenerse en cuenta que la eliminación de ooquistes decrece considerablemente en los individuos tras haber alcanzado los niveles máximos, que en algunos animales llegan hasta  $10^6$  ooquistes/gramo sin manifestaciones clínicas y que, en ocasiones, pueden observarse signos clínicos de coccidiosis en el periodo de prepatencia y, por tanto, en ausencia de eliminación de ooquistes (**Daugshies y Najdrowski, 2005; Wright y Coop, 2007**).

El método de diagnóstico más utilizado para la confirmación de una infección por coccidios es el análisis coprológico. Como análisis cualitativo se utiliza la concentración por flotación con solución saturada de NaCl con el fin de demostrar la presencia de ooquistes en heces, mientras que para el análisis cuantitativo suele recurrirse a la técnica de McMaster modificada (**Thienpont *et al.*, 1979; Bangoura y Daugshies, 2007**). El recuento de ooquistes por gramo de heces (OPG) permite estimar el grado de parasitación de los cabritos para, de esta forma, establecer una administración más racional de los anticoccidióticos, tanto con fines terapéuticos como profilácticos (**Ruiz *et al.*, 2012; Iqbal *et al.*, 2013**). Recientemente, también se ha demostrado la utilidad del método micro y macro FLOTAC para el diagnóstico y recuento del número de coccidios presentes en muestras fecales (**O'Grady y Slocombe, 1980**).

Hay que tener en cuenta que, probablemente, los coccidios están presentes en todos los animales, por lo que la mera presencia de ooquistes en las heces no es un motivo suficiente para el diagnóstico de la coccidiosis. Por este motivo, antes de emitir un diagnóstico definitivo se recomienda realizar un examen *post mortem* de animales jóvenes que hayan muerto tras un curso clínico compatible con infecciones por coccidios. El examen *post-mortem* puede incluir la realización de improntas o extensiones de raspados de las zonas intestinales afectadas con el fin de evidenciar las diversas fases del desarrollo parasitario, además de la constatación de lesiones inflamatorias en la mucosa intestinal (**Gregory y Catchpole, 1990; Ruiz *et al.*, 2013**).

El diagnóstico específico, importante para determinar la presencia de especies patógenas de *Eimeria* en una explotación, requiere de un estudio morfológico detallado de los ooquistes esporulados. Con tal fin, las heces portadoras de ooquistes se recomienda incubarlas con determinados compuestos oxidantes, como el dicromato potásico, para facilitar que los ooquistes completen el proceso de esporulación, ya que

el ooquiste, una vez que ha esporulado, dispone de un mayor número de parámetros morfológicos y estructurales para su caracterización **(Berenguer, 2006)**. También es posible diagnosticar la coccidiosis e identificar las diferentes especies de *Eimeria* que afectan al animal mediante técnicas de biología molecular, siendo la PCR (polymerase chain reaction) la técnica más utilizada **(Comes et al., 1996)**. En diversos estudios realizados en coccidios parásitos de pollos **(Gadelhag et al., 2015)** y ovinos **(Yang et al., 2014)** ha demostrado ser un método rápido, eficiente y con alta sensibilidad.

También se podría recurrir al diagnóstico serológico cuando se dispone de antígenos especie-específicos. Por otro lado, el inmunodiagnóstico para la detección de antígenos parasitarios solubles en heces o en biopsias de tejidos también sería factible si se logran obtener anticuerpos, especialmente monoclonales, suficientemente específicos **(Miller, 1990)**. Recientemente, se han realizado ensayos ELISA con antígenos de esporozoítos y merozoítos de *E. tenella* obteniéndose resultados satisfactorios como técnica de diagnóstico para la coccidiosis aviar **(Constantinoiu et al., 2007)**. Sin embargo, estos métodos no se han desarrollado para la identificación de la coccidiosis producidas por especies del género *Eimeria* en rumiantes, aunque sí para otras enfermedades parasitarias producidas por coccidios, como neosporosis o criptosporidiosis **(Williams et al., 1997; Teixeira et al., 2011)**.

Por último, se debe realizar un diagnóstico diferencial respecto a otras patologías gastrointestinales atribuidas a parásitos u otros agentes causales (colibacilosis, enterotoxemia, salmonelosis, enteritis viral, etc.) o incluso respecto a las diarreas que se producen como consecuencia de dietas inadecuadas **(Smith y Sherman, 2009)**.

### 3.2.4. TRATAMIENTO, PROFILAXIS Y CONTROL

#### 3.2.4.1. Anticoccidiósicos sintéticos

El tratamiento de la coccidiosis en rumiantes se basa principalmente en el uso de antiparasitarios químicos, entre ellos las sulfonamidas, el diclazuril, el tortrazuril, el decoquinato, etc.

El tratamiento con sulfonamidas suprime la producción de ooquistes en infecciones subclínicas y previene de la adquisición de infecciones naturales. También las nitrofurazonas se ha descrito que reducen la mortalidad y la morbilidad producida por infecciones mixtas de varias especies del género *Eimeria*. Estos compuestos, además de contribuir a mejorar el estado general de animal, disminuyendo la pérdida de peso en caprinos infectados por coccidiosis, inhiben totalmente la eliminación de ooquistes en las heces **(Soulsby, 1988; Kimbita et al., 2009)**. Por otro lado, se ha observado que el amprolium, administrado en el agua de bebida o en el alimento, es un compuesto eficaz en coccidiosis de ovejas y cabras, siendo capaz de reducir de forma rápida la producción de ooquistes y de promover la recuperación clínica de los animales **(Soulsby, 1988)**. Así, en un estudio realizado por **Iqbal et al. (2013)**, se demostró que el tratamiento de caprinos con amprolium durante cinco días

consecutivos a dosis de 50 mg/Kg conseguía reducir totalmente el recuento de ooquistes en heces durante 21 días.

El diclazuril, derivado del acetonitrilo benceno comúnmente utilizado frente a coccidios en ovejas y ganado vacuno, así como en las coccidiosis aviarias, también ha demostrado tener un efecto frente a la coccidiosis caprina (**Ruiz *et al.*, 2012**). En dicho trabajo se confirmó que el fármaco no sólo reducía el número de ooquistes en heces sino que mejoraba la tasa de crecimiento de los animales. Del mismo modo, el tortrazuril, un compuesto que proviene del mismo derivado que el diclazuril, también se ha observado que presenta una alta eficacia en el tratamiento de la coccidiosis caprina, produciendo la eliminación total de los ooquistes en heces hasta 28 días después de tratamiento con una única administración (20 mg/Kg) (**Iqbal *et al.*, 2013**). Por último, el decoquinato también ha mostrado tener una elevada actividad como anticoccidiósico, considerándose un compuesto altamente efectivo y seguro para los caprinos (**Foreyt *et al.*, 1986**; **Morand-Fehr *et al.*, 2002**).

#### 3.2.4.2. Medidas higiénicas y de manejo de los animales

En la profilaxis y el control de la coccidiosis en rumiantes es de gran importancia la limpieza y desinfección de los establos y camas. Se recomienda que todos los corrales se mantengan limpios y secos, y que los comederos y bebederos se construyan de forma que no haya contaminaciones por heces. La cama se ha de cambiar con frecuencia para evitar una acumulación excesiva de ooquistes esporulados (**Soulsby, 1988**). Por último, cuando a los animales de cría se les suministren alimentos concentrados en el pasto, las áreas de alimentación se cambiarán regularmente. Todo esto contribuirá a disminuir la carga parasitaria presente en el ambiente, reduciéndose así la posibilidad de nuevas infecciones o reinfecciones de los animales. Además, contribuyen al buen control de la enfermedad el manejo correcto de los animales en los diferentes estados de producción. Así, en épocas de partos, donde es común el hacinamiento de madres e hijos, habría que extremar las medidas higiénicas del corral. Por otro lado, en regímenes de lactancia artificial se ha de tener en cuenta que la contaminación fecal no sólo puede afectar a las camas, sino también a los utensilios o, incluso, al propio alimento (**Hidalgo y Cordero del Campillo, 2000**). Otro período de riesgo donde aumenta la posibilidad de infección y la aparición de coccidiosis clínica es el momento del destete, probablemente debido al cambio de alimentación y al estrés que sufren los cabritos (**Ruiz *et al.*, 2006**). También se considera crítico el momento en el que los cabritos pasan al cebadero, ya que, nuevamente, el hacinamiento de los animales y la falta de higiene pueden incrementar la tasa de infección (**Kanyari *et al.*, 1993**).

Al igual que en otras infecciones parasitarias, como las producidas por nematodos gastrointestinales, la rotación de pastos es esencial para prevenir la enfermedad. Generalmente, los ganaderos tienen la costumbre de colocar a los animales en la misma zona de pastoreo año tras año, aumentando así las posibilidades de contaminación. En el caso de que no fuera posible hacer este tipo de rotación, mantener las zonas de pastos drenadas y libres de deyecciones se ha observado que

disminuye las infecciones por coccidios (**Gregory *et al.*, 1989; Daugshies y Najdrowski, 2005; Chartier, 2011**).

Existen numerosos productos que pueden ser empleados para la limpieza y desinfección en la producción avícola y que son capaces de inhibir el ciclo exógeno de diferentes especies de *Eimeria* en aves, como el hidróxido de amonio y el fenol (**Samaha *et al.*, 2013**). Los mismos productos serían susceptibles de ser utilizados también en los sistemas de producción en bovinos, ovinos y caprinos.

#### **3.2.4.3. Suplementos nutricionales**

Al igual que otros aspectos, el uso de suplementos nutricionales como profilaxis a la infección por coccidios se ha estudiado ampliamente en aves pero no en rumiantes. De este modo, se ha demostrado que el uso de probióticos puede ser una alternativa a los profilácticos usados frecuentemente en la producción avícola frente a coccidios. Así, se ha observado que los probióticos añadidos en el agua y comida aumentan la viabilidad de los pollos infectados por coccidios disminuyendo las lesiones y el número de ooquistes eliminados en las heces (**Ritzi *et al.*, 2014**). También ha dado buenos resultados la suplementación del agua de bebida con levadura de cerveza, posiblemente por estimular la respuesta inmune de los animales, y con ello disminuir la gravedad de la sintomatología de las infecciones por diferentes especies del género *Eimeria* (**Shanmugasundaram *et al.*, 2013**).

### **3.3. NUEVAS ALTERNATIVAS DE CONTROL TERAPÉUTICO**

Como se comentó en apartados anteriores, el control de las enfermedades parasitarias está basado principalmente en el uso de antiparasitarios químicos. Sin embargo, el aumento de la aparición de resistencias a los antiparasitarios, tanto antihelmínticos como anticoccidiósicos, ha estimulado la búsqueda de nuevas alternativas de control y terapia.

La resistencia frente a antihelmínticos se ha descrito en la mayoría de los grupos farmacológicos, incluyendo benzimidazoles, lactonas macrocíclicas, etc. Tal y como se recoge en una revisión realizada por **Kaplan (2004)**, las primeras evidencias que se tienen sobre resistencias a antihelmínticos datan de finales de los años 50 y comienzos de los 60, cuando se describe la aparición de cepas de *H. contortus* resistentes a la fenotazina y al tiabendazol. A partir de ese momento, el fenómeno de resistencia antihelmíntica se extiende a otros nematodos y a otros fármacos, entre ellos la mayoría de los benzimidazoles. A partir de aquí, se introducen nuevos productos antiparasitarios para el tratamiento y prevención de las nematodosis gastrointestinales en ganadería pero, debido a su uso inadecuado, sólo 10 años después empiezan a aparecer resistencias frente a todos ellos. De este modo, diferentes evidencias de resistencia antihelmíntica frente a avermectinas o milbemicinas se han publicado en diferentes partes del mundo donde es importante la producción ganadera (**Kaplan, 2004**).

Recientemente, se ha confirmado la existencia de cepas de *H. contortus* resistentes al levamisol, albendazol y la ivermectina en granjas de caprinos de Uganda y Sudáfrica, en porcentajes cercanos al 60 % en el caso de la ivermectina (**Nebuyenka et al., 2014, Tsetetsi et al., 2013**). Además de a estos productos, en Brasil se han descrito la aparición de resistencia frente al closantel, demostrable no sólo en base a los recuentos de huevos en heces, sino también al evaluar el efecto del fármaco *in vitro* sobre los vermes adultos de *H. contortus* y la evolución de las larvas 3 del parásito (**Almeida et al., 2010**). Igualmente, unos altos niveles de resistencia frente a levamisol, moxidectina y closantel (42, 50 y 67 %, respectivamente) se han descrito en varias granjas de ovinos en el sur de Queensland (Australia) (**Lyndal et al., 2014**).

En Europa, también se han realizado estudios de resistencias a antihelmínticos en el ganado caprino y ovino. En Francia, por ejemplo, se ha demostrado un incremento del nivel de resistencia de nematodos gastrointestinales frente al albendazol en los últimos 15 años, particularmente en cabras en producción; además, se sabe de la existencia de casos de resistencia a la ivermectina y al levamisol (**Hoste et al., 2002**). Del mismo modo, un estudio realizado por **Dolinská et al. (2014)** en granjas de ovinos en Eslovaquia ha confirmado el aumento de la resistencia frente a benzimidazoles y lactonas macrocíclicas como la ivermectina. La resistencia a este último fármaco y al febendazol también se ha detectado en altos porcentajes en Dinamarca, resultado del uso frecuente e inadecuado de ambos compuestos en las granjas de ganado caprino del país (**Holm et al., 2014**).

El fenómeno de las resistencias a los antihelmínticos en el ganado ovino se ha estudiado desde su aparición, no siendo así en el caso del ganado caprino. Entre las causas de la frecuente aparición de resistencias en la cabra, no sólo frente a antihelmínticos sino a otros antiparasitarios, se ha descrito la alta frecuencia de los tratamientos antihelmínticos llevados a cabo en esta especie, posiblemente debido a su baja capacidad para desarrollar una fuerte respuesta inmune a las infecciones por nematodos. Además, debido a la restringida disponibilidad de antihelmínticos cuyo uso está permitido en el periodo de producción lechera, su empleo reiterado ha sido, probablemente, excesivo. A las causas de que los caprinos presenten mayor probabilidad de promover fenómenos de resistencia antiparasitaria ha de sumarse la administración de dosis inadecuadas, ya que la totalidad de los productos han sido diseñados para el tratamiento del ganado ovino y es reconocido que el metabolismo en los caprinos es más elevado y, por tanto, menor la biodisponibilidad de los fármacos a iguales dosis. Ante esta circunstancia, muchos veterinarios optan por administración de dosis terapéuticas dobles en los caprinos en relación con los ovinos, pero los ganaderos no siempre son conscientes de esta información, así como de las pautas correctas de dosificación, incluyendo el pesaje de los animales (**Hoste et al., 2002**).

Como ya se ha comentado, la existencia de resistencia antiparasitaria también afecta a los anticoccidiósicos. En rumiantes hay indicios de resistencia antiocccidiósica, pero hasta el momento no existen publicaciones que lo confirmen. Sin embargo, este fenómeno ha sido ampliamente estudiado en aves de corral, existiendo una gran variedad de estudios que analizan y evalúan el incremento de resistencias a los productos anticoccidiósicos comúnmente utilizados frente a la coccidiosis aviar. Una

revisión realizada por **Chapman et al. (2010)** describe la evolución de la disminución de la sensibilidad a la monesina, antibiótico utilizado frecuentemente como anticoccidiósico, desde que fue usado por primera vez en Estado Unidos en 1971. Este compuesto fue introducido en las granjas de producción de pollos del país porque, ya entonces, se había observado resistencia a los productos que se utilizaban hasta esa fecha, como las sulfaquinolonas. A partir de entonces, debido a la novedad y al uso indiscriminado de este producto comienzan a presentarse los primeros casos de cepas de *Eimeria* spp. resistentes a la monesina. Otro medicamento usado a menudo en las granjas de producción avícola es el diclazuril (**McDougald et al., 1990**). Ya en 1994 se publicó el primer estudio donde se demuestra que diferentes aislados de *Eimeria* spp. presentaban resistencia parcial o total al diclazuril, el cual sólo fue efectivo en aquellas granjas donde nunca se había utilizado el fármaco, confirmándose así que una de las principales causas de la aparición de resistencias están relacionadas con el uso continuo de los productos (**Kawazoe et al., 1994**). La evolución de la resistencia en varios compuestos como la monesina, el diclazuril, la halofunginona o la salinomicina también fue estudiada por **Peek et al. (2003)** en diferentes aislados de *Eimeria* spp. aviares en tres años diferentes (1996, 1999 y 2001). En este período de tiempo se evaluó la eficacia de los tratamientos observándose que, con diferentes grados, la resistencia anticoccidiósica aumentaba en todos los productos a lo largo de los años.

Al igual que en el caso de los antihelmínticos, la resistencia a los anticoccidiósicos está distribuida a nivel mundial, siendo importante, sobre todo, en aquellos países donde la producción de pollos es elevada. En un estudio realizado en Irán, donde los tres productos utilizados comúnmente frente a los coccidios aviares son la salinomicina, el amprolium y el diclazuril, se observó que ninguna de las especies de *Eimeria* aisladas era totalmente sensible a los tres compuestos, confirmándose así la presencia de resistencia. En este estudio se establecen tres índices que se consideran necesarios para cualquier evaluación de resistencia a anticoccidiósicos: (1) el índice global, que se calcula a partir de la ganancia de peso, la conversión del alimento y el número de ooquistes eliminados en heces y lesiones; (2) la óptima actividad anticoccidiósica, que se establece observando el crecimiento y el ratio de supervivencia de los animales; y (3) el test de sensibilidad anticoccidiósica, con el cual se evalúa la reducción de las lesiones provocadas por la infección por coccidios (**Arabkhazaeli et al., 2013**).

Sin lugar a dudas, los antiparasitarios comerciales han sido una herramienta importante para el control de las enfermedades parasitarias, incluidas las infecciones por nematodos y coccidios. Sin embargo, la creciente aparición de resistencias antes señalada, la creciente preocupación entre algunos consumidores por la presencia de residuos químicos sintéticos en carne y leche, y el mayor interés por el consumo de animales de producción ecológica, han contribuido a la búsqueda de nuevas alternativas de control para dichas enfermedades, como son: el control biológico, la inmunoprofilaxis, la selección de razas resistentes y la fitoterapia.

### 3.3.1. CONTROL BIOLÓGICO

La utilización de microorganismos se considera una prometedora opción para el control biológico de las infecciones parasitarias en rumiantes. Se basa en la neutralización de las formas infectantes de los parásitos mediante hongos, bacterias e incluso virus.

En los últimos años, se ha demostrado que la presencia de hongos en las heces de los animales de producción puede reducir el número de larvas infectantes en el pasto, por lo que se ha propuesto como una medida de control de las nematodosis. Por ejemplo, *Duddingtonia flagrans* ha demostrado tener la capacidad de disminuir la intensidad y severidad de las infecciones por *Haemonchus contortus* en ovinos sin producir un efecto negativo sobre nematodos no parásitos que habitan en el suelo (Knox *et al.*, 2002; Casillas *et al.*, 2008). Del mismo modo, en cultivos de larvas de nematodos pertenecientes a la familia Trichostrongylidae se observó que, después de 7 días de incubación con diferentes tipos de hongos que habían sido aislados previamente de las heces de los animales infectados (*Cladosporium spp.*, *Trichoderma spp.* y *Fusarium equiseti*), hubo una disminución significativa en el desarrollo y la viabilidad de las larvas (Zarrin *et al.*, 2015). Además, mediante la utilización de hongos, también es posible favorecer la descomposición o el enterramiento del material fecal y, con ello, aumenta la tasa de degradación de las de las larvas debido a una mayor exposición a las inclemencias del tiempo; por otro lado, la descomposición fecal impediría el movimiento de las larvas hacia el pasto al no existir el medio de llegar hasta el mismo (Vlassoff *et al.*, 2001; Williams y Warren 2004).

### 3.3.2. INMUNOPROFILAXIS

Dentro de las nuevas estrategias de control de las enfermedades parasitarias también se encuentra el uso de vacunas, pudiendo ser su aplicación una fuerte competencia con los fármacos antihelmínticos (Dalton y Mulcahy, 2001).

Frente *Haemonchus contortus* se ha podido inducir una respuesta inmunoprotectora frente al parásito utilizando tanto antígenos naturales de L3 como antígenos de origen somático y de E/S procedentes de vermes adultos (Jacobs *et al.*, 1999, Domínguez-Torano *et al.*, 2000). Así mismo, se ha descrito un importante número de antígenos ocultos que confieren inmunoprotección frente a este nematodo, como el polímero contortina (Munn *et al.*, 1987), la proteína H11 (Andrews, 1997) o el complejo P1 (Smith *et al.*, 1993), entre otros. También se han investigado las propiedades inmunoprotectoras de un grupo de enzimas proteolíticas que, igualmente, han sido aisladas, bien de los productos de excreción-secreción (Kararu *et al.*, 1993; Molina *et al.*, 1994; Rhoads y Fetterer, 1995), o bien de homogeneizado somáticos de vermes adultos de *H. contortus* (Cox *et al.*, 1990; Pratt *et al.*, 1992; Molina *et al.*, 1994). Entre las enzimas proteolíticas extraídas de este nematodo gástrico, las proteinasas tipo cisteína han demostrado tener un importante efecto protector frente a las infecciones experimentales, tanto en cabras como en ovejas (Molina *et al.*, 2012). En los trabajos llevados a cabo por

**Knox et al. (1999)**, a partir de homogeneizados de vermes adultos de *H. contortus*, se aislaron fracciones con actividad cisteína proteínasa capaces de inducir un elevado grado de protección frente al parásito en ovinos inmunizados con el producto obtenido. Los resultados del estudio realizado por **Martín et al. (2015)** en infecciones experimentales de *H. contortus* en ovejas y cabras mostraron que este tipo de proteínas producía, inmunoprotección frente a la enfermedad en asociación con niveles altos de IgG en suero. Recientemente, **Dicker et al. (2014)** demostraron que la inmunización con este tipo de proteinasas reducían los recuentos de huevos en heces y la carga parasitaria en valores cercanos al 90 %.

Mucho menor es el número de estudios sobre la inmunoprofilaxis frente a coccidios en rumiantes. En este aspecto, cabría mencionar el ensayo realizado por **Ruiz et al. (2014)** en caprinos, cuyo objetivo fue comprobar si animales inoculados oralmente con ooquistes esporulados de *Eimeria ninakohlyakimovae* atenuados mediante irradiación X adquirirían inmunidad frente a una reinfección. Los resultados del estudio demostraron que la inmunización reducía significativamente el número de ooquistes eliminados en las heces de los animales vacunados, así como la sintomatología y lesiones de los mismos.

Las publicaciones sobre inmunoprofilaxis frente a coccidios son más numerosas en relación a las coccidiosis aviares. Para la prevención de la enfermedad en aves existen una gran variedad de vacunas comercializadas, que incluyen vacunas vivas (**McDonald y Shirley, 2009**), vacunas vivas atenuadas, como Paracox® y Livacox® (**Jeffers, 1975; Shirley and Millard, 1986; Bedrnik, 1989**), o aquellas que están basadas en el uso de cepas menos virulentas del parásito, como NobilisCox ATM®. Aunque aún sin comercializar, otras vacunas han utilizado ADN recombinante de especies de *Eimeria* aviares como método de protección (**Ding et al., 2005; Ma et al., 2011**). Más recientemente, la inmunización oral, en perlas de gel y spray, con dosis bajas de ooquistes del género *Eimeria* se ha comprobado que aumenta la resistencia a la infección por coccidios de pollos criados en suelo, los cuales no mostraron una reducción de la ganancia de peso ni de la conversión del alimento, dos indicadores de la presencia de coccidiosis en aves (**Jenkins et al., 2013**). Además de la inmunización oral con ooquistes, la inoculación subcutánea con proteínas extraídas de ooquistes y esporozoítos de *Eimeria tenella* ha tenido resultados significativos, destacando la inmunización con esporozoítos, con la que se obtuvo un nivel de protección del 99 % (**Al-Idreesi et al., 2013**).

### 3.3.3. SELECCIÓN DE RAZAS RESISTENTES

La selección genética de razas resistentes se considera otra de las nuevas alternativas de control de las parasitosis, siendo muchos los métodos que se han utilizado para seleccionar a los animales para la mejora de las razas. Recientemente, aparte de los parámetros de producción y reproducción habituales, también se han considerado diferentes parámetros de resistencia a patógenos. Así, los recuentos de huevos en heces se han utilizado como indicador de la resistencia natural de los caprinos a los nematodos gastrointestinales, por lo que los animales con menores

recuentos podrían seleccionarse para la mejora genética de la raza (**Gunia et al., 2013**). Otro método sería el estudio genético para la identificación de secuencias que estén relacionadas con la respuesta inmune frente a nematodos gastrointestinales o, incluso, que estén asociadas directamente a la resistencia en razas que han demostrado ser menos susceptibles a las infecciones por nematodos en áreas donde la prevalencia de las mismas es alta (**McRae et al., 2014, Benavides et al., 2015**).

Los estudios de la selección de razas resistentes es mucho menor en relación a la coccidiosis, existiendo únicamente publicaciones en las que se establecen frecuencias y repetibilidad de la eliminación de ooquistes en corderos para establecer un punto de partida para una posible selección genética basada en los recuentos de ooquistes de *Eimeria* spp. en ovejas Rhön (**Gauly et al., 2001**).

### 3.3.4. FITOTERAPIA PARASITARIA

El empleo de las plantas medicinales se ha demostrado útil en el control de la mayoría de los grupos de parásitos, incluyendo protozoos, trematodos, cestodos, nematodos y artrópodos.

A modo de ejemplo, se ha observado que determinadas plantas, como *Jacaranda glaba*, presentan actividad frente al protozoo *Plasmodium falciparum*, causante de la malaria (**Gachet et al., 2010**). Además, estudios *in vitro* realizados con tres plantas usadas en la medicina tradicional de Arabia Saudí (*Argemone octroteuca*, *Capparis spinosa* y *Heliotropium curassavicum*) demostraron actividad frente a diferentes protozoos, como *P. falciparum*, *Leishmania infantum*, *Trypanosoma brucei* y *T. cruzi* (**Abdel- Sattar et al., 2010**). Frente a estos mismos parásitos, **Bradacs et al. (2010)** realizaron un estudio con 18 plantas de uso tradicional en el Archipiélago de Vanuatu y muchas de ellas demostraron tener gran actividad antiparasitaria, si bien en algún caso esta actividad estuvo acompañada de una elevada citotoxicidad. Los estudios de fitoterapia aplicada al control de la leishmaniosis se han realizado frente a las diferentes especies de *Leishmania*, incluyendo *L. amazonensis*, *L. infantum* o *L. donovani* y han incluido un importante número de plantas. En este sentido, se ha observado que *Lyngbya majuscula* (**Balunas et al., 2010**), flavonoides de *Lychnopora markgranii* (**Salvador et al., 2009**) y *Enanthia chlorantha* (**Nkewengoua et al., 2009**) presentan una alta actividad frente a este protozoo. Sin embargo, otros extractos vegetales ensayados no mostraron el mismo efecto, como los procedentes de *Tinospora sinensis* (**Maurya et al., 2009**) o algunos elaborados a partir de las plantas *Erodium malacoides*, *Hyparrhenia hirta*, *Trymeleaea hirsuta* y *Pulicaria crispa* (**El-On et al., 2009**).

Así mismo, se han llevado a cabo ensayos para evaluar la actividad de ciertas plantas frente a cestodos. Un ejemplo lo constituye el estudio realizado por **Sadjjadi et al. (2008)**, quienes demostraron que el extracto de cloroformo procedente de *Allium sativum* tenía actividad frente a los protoescólex de los quistes hidatídicos de *Echinococcus granulosus*. Aparte, en un ensayo *in vivo* usando ratones infectados de forma natural con *Hymenolepis nana*, se observó que *Nigella sativa* producía una

reducción de la carga parasitaria en el intestino de los ratones y, por lo tanto, una disminución en la eliminación de huevos con las heces (**Ayaz et al., 2007**). Finalmente, la planta *Commiphora molmol* ha demostrado tener una gran efectividad para disminuir la carga parasitaria de los adultos de *Moniezia expansa* en ovejas infectadas de forma natural (**Haridy et al., 2004**).

Por otro lado, en varias especies vegetales de *Dryopteris* (**Magalhães et al., 2010**) y en *Curcuma longa* (**Shoheib et al., 2008**) se ha demostrado actividad frente al trematodo *Schistosoma mansoni*; en el primer caso, el efecto se observó frente a los parásitos adultos (provocaban una reducción de la carga parasitaria, alteraba el desarrollo del verme y disminuía la puesta de huevos) y, en el segundo caso, la actividad se demostró frente a las cercarías del parásito. También se han estudiado plantas con efectos sobre *Fasciola gigántica*, entre ellas *Allium sativum* y *Piper longum* (**Singh et al., 2009b**), el extracto etanólico procedente del tallo de *Meryta denhawii* Seem (**Shehab et al., 2009**) y el extracto acuoso de *Artocarpus lakoocha* (**Sobhon et al., 2009**). El efecto de las tres plantas se estudió *in vitro* frente a los vermes adultos de *Fasciola* y se observó que todos ellos causaban daños a nivel del tegumento y reducción de la movilidad y la viabilidad de los vermes.

Finalmente, la actividad antiparasitaria de plantas también se ha probado frente a artrópodos, fundamentalmente frente a diferentes dípteros que actúan como transmisores de otras enfermedades. Así, *Cymbopogon citratus* y *Croton macrostachyus* causaron la muerte de las larvas de *Anopheles arabiensis* Patton en un alto porcentaje después de 24 horas de exposición (**Kanrunamoorthi et al., 2010**). De la misma forma, *Solanum xanthocarpum* demostró un importante efecto larvicida frente a larvas de varias especies de mosquitos de la familia Culicidae, aunque con diferencias según la especie evaluada (**Bansal et al., 2009**). También existen plantas con efectos repelente frente a *Aedes albopictus*, como el aceite esencial de *Piper aduncum* (**Misni et al., 2009**). Ejemplos adicionales de estudios de fitoterapia realizados frente a otros artrópodos incluyen los llevados a cabo con *Erythrina indica lectin*, que presenta actividad ovicida y larvicida frente a la mosca de la fruta (**Singh et al., 2009a**), y los realizados con aceite esencial de eucalipto, que demostraron un importante efecto pediculicida (**Tolozá et al., 2010**).

### 3.3.4.1. Plantas con actividad frente a nematodos

#### 3.3.4.1.1. Ensayos *in vitro*

Este tipo de ensayos permite la realización de test a bajo costo, con un número alto de replicaciones y utilizando pocos materiales. Además, una de sus grandes ventajas es la posibilidad de automatización de los procesos. Entre las desventajas asociadas a este método pueden citarse la imposibilidad de reproducir idénticamente las condiciones naturales, por ejemplo, la temperatura corporal de los animales o el estado de los tejidos (si se estuviese trabajando con células). Aun así, es este tipo de ensayos el más utilizado en la actualidad, debido, sobre todo, al avance de su

perfeccionamiento de las técnicas laboratoriales y a las limitaciones del uso de animales para experimentación (**Hartung et al., 2009**).

Algunos de los ejemplos de ensayos *in vitro* más utilizados para el estudio de la actividad antihelmíntica de extractos vegetales son: el ensayo de eclosión de huevos, el ensayo de desarrollo larvario, los ensayos de parálisis larvaria o los de viabilidad de los adultos.

Para realizar el ensayo de eclosión de huevos es necesario recoger heces de los animales infectados y, a continuación, purificarlos, concentrarlos y realizar un recuento en una cámara de McMaster. Tras haber conseguido suficiente cantidad, los huevos se dispensan en placas de cultivo, normalmente de 24 pocillos, y sobre ellos se añaden los extractos que se quieran estudiar a diferentes concentraciones. Después de un periodo de incubación determinado en una estufa a 28 °C se realiza el recuento de larvas (tanto vivas como muertas) y huevos no eclosionados (**Alawa et al., 2003**).

Varios autores han demostrado que distintas plantas son capaces de inhibir en altos porcentajes la eclosión de los huevos. Por ejemplo, el extracto acuoso elaborado a partir de hojas de *Annona muricata* redujo en un 84,91 % la eclosión de los huevos de *H. contortus* a una dilución del 50 %; esta actividad fue cercana al 50 % incluso a concentraciones del 6,25 % (**Ferreira et al., 2013**). Otras plantas de la familia Annonaceae fueron estudiadas por varios autores (**Souza et al., 2008**), demostrándose la actividad ovicida del extracto de acetato de etilo de *Annona squamosa* frente a diferentes nematodos gastrointestinales. Con anterioridad, en un estudio realizado por **Alawa et al. (2003)**, se demostró que *Annona senegalensis* presentaba una alta actividad antihelmíntica, disminuyendo la eclosión de los huevos de *H. contortus* en un 88,5 %, no llegándose a este mismo resultado con *Vermonia amygdalina*.

También se comprobó actividad ovicida frente a *H. contortus* utilizando extractos de *Chenopodium album* y *Caesalpinia crista* (**Jabbar et al., 2007**), así como con extractos de *Ziziphus nummularia* y *Acacia nilotica* (**Bachaya et al., 2009**), *Hedera helix* (**Equale et al., 2007a**), *Coriandrum sativum* (**Equale et al., 2007b**), *Maesa lanceolata* y *Plectranthus punctatus* (**Tadesse et al., 2009**), *Melia azedarach* (**Maciel et al., 2006**) y *Cucurbita moschata* (**Marie-Magdeleine et al., 2009**), *Thymus capitatus* (**Boubaker et al., 2013**) y *Artemisia annua* (**Cala et al., 2014**).

Otro método *in vitro* muy comúnmente utilizado para evaluar la actividad antihelmíntica de extractos vegetales ha sido el ensayo de desarrollo larvario. Este ensayo se realiza generalmente en placas de 24 pocillos, donde se añaden los huevos, medio de crecimiento y antifúngicos para evitar el crecimiento de hongos. Las placas se incuban a temperatura ambiente y, después de 48 horas, se administran las distintas diluciones del extracto. Tras una semana, se observarán con Lugol los distintos estados larvarios que se han desarrollado, realizándose la diferenciación entre larvas que se encuentran como L3 y las que se encuentran como L1 y L2 (**Assis et al., 2003**).

También ciertos estudios se han llevado a cabo para comprobar la capacidad de algunas plantas para inhibir el desarrollo de las larvas de diferentes nematodos. Así, se

ha encontrado efectividad en los extractos de *Ziziphus nummularia* y *Acacia nilotica* (Bachaya *et al.*, 2009). También se ha demostrado actividad larvicida en los extractos acuosos e hidro-alcohólicos procedentes de las hojas y frutos de *Maesa lanceolata* y *Plectranthus punctatus*, donde se llegó a observar el 100 % de inhibición del desarrollo larvario a una concentración de 50 mg/ml cuando se utilizó el extracto hidro-alcohólico del fruto de *Maesa lanceolata* (Tadesse *et al.*, 2009). Igualmente, se encontró actividad larvicida en la planta *Melia azedarach* (Maciel *et al.*, 2006), así como en los extractos de *Spigelia anthelmia* Linn, los cuales produjeron una inhibición del desarrollo larvario hasta del 80 % (Assis *et al.*, 2003). Recientemente, estudios realizados por Cala *et al.* (2012; 2014) han demostrado que diferentes extractos procedentes de *Melia azedarach*, *Trichilia clausenii* y *Artemisia annua* inhiben el desarrollo larvario en porcentajes cercanos al 100 %. Esta actividad no sólo fue observada en larvas de *H. contortus* sino en otros nematodos gastrointestinales como *Trychostrongylus* sp. u *Oesophagostomun* sp.

Cuando se quiere medir la parálisis larvaria de las L3 *in vitro* provocada por el antihelmíntico en evaluación se depositan las larvas del parásito en una placa de cultivo con las diferentes concentraciones del extracto. Estas placas se incuban durante 24 horas y, transcurrido este tiempo, se clasifican las larvas como normales, si se mueven, o como paralizadas, si no se observa movimiento después de 5 segundos (Várady *et al.*, 1999). Algunas plantas o sus derivados han llegado a inhibir la movilidad de las larvas de *H. contortus* en porcentajes muy elevados, por ejemplo los flavonoides obtenidos a partir de *Struthida argentea*, cuya actividad en uno de ellos fue del 90 % a una concentración de 3,1 µg/ml (Ayers *et al.*, 2008). También con los extractos de *Clisampelos capensis* se obtuvo una actividad del 90 % (Ayers *et al.*, 2007), siendo este resultado parecido al obtenido al evaluar la actividad larvicida del extracto acuso de *Annona muricata* (Ferreira *et al.*, 2013).

Por último, también es posible evaluar la actividad antihelmíntica de un extracto vegetal mediante el análisis de la viabilidad de los adultos. Para este ensayo se han de recolectar los adultos del abomaso de los animales sacrificados. Los ensayos se realizan tras lavar los vermes y suspenderlos en tampón fosfato salino (PBS). Las incubaciones se llevan a cabo en placas de Petri donde se añaden los extractos a las concentraciones que se vayan a evaluar. Después de incubar los vermes, se observa su movilidad a los intervalos de tiempo seleccionados (Jabbar *et al.*, 2007).

El efecto adulticida frente a *H. contortus* se ha demostrado en ensayos de diferentes plantas como *Ziziphus nummularia* y *Acacia nilotica* (Bachaya *et al.*, 2009). También se demostró efectividad frente a adultos en los extractos procedentes de *Hedera helix*, donde se encontraron diferencias, incluso, entre sexos, siendo mayor el efecto frente a los machos que frente a las hembras del parásito (Equale *et al.*, 2007a). Otras plantas, como *Coriandrum sativum* (Equale *et al.*, 2007b), *Swertia chirata* (Iqbal *et al.*, 2006a) y *Cucurbita moschata* (Marie-Magdeleine *et al.*, 2009), también han demostrado tener efecto adulticida, llegando a ser la actividad de esta última de hasta el 59,2 % después de 24 horas de incubación.

Los estudios *in vitro* para verificar la actividad antihelmíntica de extractos vegetales también se han llevado a cabo en nematodos no necesariamente gastrointestinales. De este modo, **Qamaruddin et al. (2002)** comprobaron que el extracto alcohólico de *Psoralea corylifolia* provocaba la disminución de la movilidad de las microfilarias de *Setaria cervi*, filaria propia del ganado. Así mismo, se demostró que los extractos de *Azadirachta indica* tenían efecto sobre las microfilarias de este mismo filárido, siendo letal su efecto en este caso (**Mishra et al., 2005**).

#### 3.3.4.1.2. Ensayos *in vivo*

Los ensayos *in vivo* se denominan de esta forma porque se emplean animales de experimentación en su metodología. En general, este tipo de ensayos supone un menor coste que los ensayos *in vitro*, siempre y cuando se realicen en condiciones de campo y la preparación de los extractos no sea muy costosa. Son, por otro lado, mucho más simples de realizar y tienen la ventaja adicional de que se pueden obtener resultados a partir de las condiciones naturales donde se encuentra el parásito. La gran limitación de este método, al utilizarse animales, es el no poder realizar réplicas de los ensayos, al contrario de lo que ofrecen los estudios *in vitro* (**Hartung et al., 2009**).

Para el estudio de la actividad antihelmíntica de extractos vegetales se pueden realizar diferentes ensayos, siendo dos de los más comunes la evaluación de los recuentos de huevos por gramo de heces y de la carga parasitaria.

La primera de ellas, la determinación del número de huevos por gramo de heces, es una técnica sencilla que consiste en recoger heces del recto de los animales parasitados, ya sean de forma natural o experimental, y hacer un recuento en una cámara siguiendo el método de McMaster modificado (**MAFF, 1989**).

Son muchos los autores que han utilizado este ensayo para valorar la actividad antihelmíntica de plantas. Mediante este método, se observó que *Achillea milifolium* (**Tariq et al., 2008**) y *Artemisia absinthium* (**Tariq et al., 2009**) producían una gran disminución del recuento de huevos en infecciones naturales causadas por varios nematodos, como *H. contortus*, *Trichostrongylus ovis*, *Chabertia ovin*, *Bunostomum trigonocephalum* y *Oesophagostomum columbianum*. Así mismo, se han descrito plantas como *Albizia anthelmintica* capaces de reducir el contaje de huevos hasta en un 90 % en los nematodos *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Nematodirus* y *Ostertagia* (**Gradé et al., 2008**). También se han descrito casos en los que una misma planta puede presentar actividad frente a un nematodo pero no frente a otro; así, en un estudio realizado por **Heckendorn et al. (2007)** con tres forrajes taníferos (*Cichorium intybus*, *Lotus corniculatus* y *Onobrychis viciifolia*) se redujeron los recuentos de huevos de *H. contortus* pero no los de *Cooperia curticei*. También con esta técnica se ha observado una reducción del recuento de huevos en otros nematodos como *S. papillosus* y *T. ovis* en ovejas al utilizar extractos procedentes de *Nauclea latifolia* (**Onyeyili et al., 2001**).

Igualmente, en condiciones experimentales se ha demostrado que diferentes plantas son capaces de originar una disminución del recuento de huevos de *H. contortus* en heces en porcentajes muy elevados, entre ellas *Sericea lespedeza* (**Lange**

*et al.*, 2006), *Maesa lanceolata* y *Plectranthus punctatus* (Tadesse *et al.*, 2009) y *Swertia chirata* (Iqbal *et al.*, 2006). Sin embargo, otras como *Myrsine africana* y *Rapanea melanophloeos* no tuvieron actividad frente a este parásito (Githiori *et al.*, 2002).

La segunda técnica más utilizada en la valoración de la actividad antihelmíntica de extractos vegetales es la estimación de la carga parasitaria. Para llevar a cabo esta técnica se han de sacrificar los animales y realizar un recuento e identificación de los vermes que se encuentren en el aparato digestivo de éstos (bien estómago o intestino), ya que es muy común que se trate de infecciones mixtas.

Utilizando esta última técnica, se ha observado que plantas como *Hedera helix* (Equale *et al.*, 2007a) y *Sericea lespedeza* (Terril *et al.*, 2007) reducen el número de vermes adultos de *H. contortus* en el abomaso de los animales en estudio. Del mismo modo, en experimentos realizados con *Lippia sicloides* se demostró que la actividad antihelmíntica de la planta era capaz de reducir la carga parasitaria de los animales hasta en un 59,9 % en infecciones con *H. contortus* y hasta en un 39,3 % en infecciones con *Trichostrongylus* (Camurça-Vasconcelos *et al.*, 2008).

#### 3.3.4.2. Plantas con actividad frente a coccidios

Son pocos los estudios realizados hasta el momento en los que se ha evaluado el efecto de extractos de plantas naturales frente a coccidios en rumiantes, y la mayoría de ellos constituyen experimentos *in vivo* con especies de coccidios que parasitan a aves. Los ensayos *in vitro* realizados se han centrado especialmente en el estudio del efecto de los extractos naturales sobre los esporozoítos, siendo el principal objetivo determinar si existe o no disminución de la viabilidad de esta forma parasitaria y cómo se ve afectada, por tanto, la capacidad de invasión celular. Sin embargo, recientemente se han publicado artículos que basan sus experimentos en la búsqueda de extractos que actúan inhibiendo la esporulación de los ooquistes.

##### 3.3.4.2.1. Ensayos *in vitro*

Como se comentó anteriormente, estos ensayos están principalmente dirigidos al estudio del efecto de los extractos naturales sobre los esporozoítos. Así, un estudio realizado por Khalafalla *et al.* (2011) demuestra que diferentes concentraciones de extracto de *Curcuma longa* disminuye la viabilidad de los esporozoítos de *Eimeria tenella* tras distintos periodos de incubación. Además, en este mismo estudio se observó que, a concentraciones de 100 y 200  $\mu$ M, la tasa de invasión celular disminuía en un 41,6 y 72,8 %, respectivamente. Recientemente, otros estudios han demostrado que diferentes compuestos, entre ellos derivados de las curcuminas y de *Echinacea purpurea*, disminuyen significativamente la viabilidad de los esporozoítos de *Eimeria tenella* y su tasa de invasión celular, por lo que estos extractos podrían ser considerados como posibles anticoccidiósicos añadidos a la comida o al agua de bebida (Burt *et al.*, 2013). Además, los resultados de ambos estudios muestran que los

compuestos utilizados en los ensayos no serían perjudiciales para el organismo vivo, según sugieren los resultados de citotoxicidad en cultivos celulares realizados *in vitro*.

Los ensayos *in vitro* dirigidos a evaluar la capacidad de los extractos para inhibir la esporulación de los ooquistes se han realizado con especies de *Eimeria* de diferentes especies hospedadoras. Así, a concentraciones de 1000 µg/ml, el extracto acuoso de *Pinus radiata* redujo hasta en un 86 % la esporulación de tres especies de *Eimeria* aviarias, incluyendo *Eimeria tenella* (Molan *et al.*, 2009). Sin embargo, en un estudio realizado por Saratsis *et al.* (2012) con extractos elaborados a partir de *Onubrychis viciifolia* no se observó una disminución del número de ooquistes esporulados de diferentes especies de *Eimeria* en ovejas. En este caso, el máximo porcentaje de inhibición (10,7 %) se mostró a una concentración de 1200 µg/ml después de 48 horas de incubación.

#### 3.3.4.2.2. Ensayos *in vivo*

Al igual que en el caso de los nematodos, los ensayos *in vivo* con coccidios necesitan animales de experimentación que son inoculados con el parásito y tratados con el extracto de la planta que se desea estudiar, aunque en los experimentos también se pueden utilizar animales infectados naturalmente por diferentes especies de *Eimeria*.

Para evaluar *in vivo* de la actividad anticoccidiósica de los extractos naturales se suele realizar un recuento de ooquistes por gramo de heces. Con este ensayo se pretende comprobar si existe una disminución de la eliminación de ooquistes en heces cuando el animal es tratado con un extracto vegetal. Estos recuentos se hacen en una cámara siguiendo el método de McMaster modificado (MAFF, 1989).

Mediante este tipo de ensayo, tres plantas usadas por los ganaderos de la ciudad del Cabo (Sudáfrica) demostraron un efecto antiparasitario tanto frente a helmintos como a coccidios infectados de forma natural. De este modo, a diferentes concentraciones, los extractos vegetales de la planta consiguieron reducir significativamente el número de huevos de nematodos y de ooquistes de *Eimeria* en heces (Maphosa *et al.*, 2012). También se observó disminución del número de ooquistes en heces en cabras infectadas por *Eimeria* cuando fueron alimentadas con pellets de *Sericea lespedeza*, llegando a ser esta reducción cercana al 98 % (Kommuru *et al.*, 2014).

Por otro lado, en especies de coccidios que afectan a aves, concretamente en pollos infectados experimentalmente con *Eimeria tenella*, se demostró el efecto anticoccidiósicos *in vivo* de la artemisina, que es un extracto comercial de la planta *Artemisia annua* (del Cacho *et al.*, 2010). Los resultados del estudio mostraron que la artemisina no sólo es capaz de reducir los recuentos de ooquistes por gramo de heces sino también alterar la integridad de la pared de los mismos.

En otro estudio, donde se evaluó el efecto frente a *Eimeria tenella* del aceite esencial de orégano como suplemento en la dieta de broilers infectados experimentalmente con este parásito, se consiguió una disminución significativa del

número de ooquistes eliminados en heces de los animales que fueron alimentados con el suplemento en relación a los controles (**Giannenas et al., 2003**). En dicho trabajo también se valoraron otros parámetros, como la supervivencia de los animales infectados, el nivel de sangre en las diarreas y el grado de las lesiones tras el sacrificio de los animales, resultando todos ellos disminuidos tras la administración del suplemento en la dieta. No obstante, el efecto encontrado a la dosis utilizada (300 mg/Kg) fue menor al mostrado por el anticoccidiósico usado como control positivo a una dosis de 75 mg/Kg. También se ha demostrado que diferentes concentraciones de *Ageratum conyzoides* y *Musa paradisiaca* reducen significativamente el número de ooquistes por gramo de heces en broilers infectados experimentalmente con *Eimeria tenella*, siendo estos resultados similares a los observados utilizando amprolium (**Nweze et al., 2009, Anosa et al., 2011**). Otros autores, como **Naidoo et al. (2008)** y **Michels et al. (2011)** también demostraron que extractos procedentes de *Tulbaghia violacea* y *Eclipta alba*, disminuían, no sólo el número de ooquistes eliminados en las heces por los animales infectados, sino, además, los síntomas de enfermedad.

En otro tipo de coccidios como *Cryptosporidium parvum*, parásito de una amplia variedad de especies hospedadoras, se evaluó la actividad de un extracto extraído de la corteza de pino (Pycnogenol) en un modelo experimental donde se inocularon ratones adultos inmunodeprimidos con ooquistes esporulados de dicho parásito (**Kim et al., 2001**). Los resultados del estudio demostraron diferencias significativas en el número de ooquistes en heces entre los animales que fueron tratados vía oral con una dosis de 30 mg/Kg/día con Pycnogenol y los controles. Sin embargo, el estudio histopatológico del intestino de los animales tras el sacrificio no reveló diferencias en cuanto a la capacidad de invasión celular del parásito; es decir, que el extracto no provocó disminución de la viabilidad e infectividad de los esporozoítos.

### 3.4. PLANTAS MEDICINALES EN LAS ISLAS CANARIAS

El Archipiélago Canario constituye, por su localización geográfica, uno de los enclaves de mayor diversidad florística y riqueza en especies autóctonas del país (**Bramwell 1998; Bramwell y Bramwell, 2002**). La existencia de endemismos es un fenómeno general en todos los territorios geográficamente bien definidos y, de ahí que las islas oceánicas sean consideradas como uno de los principales centros de diferenciación y especiación. Algo similar sucede en los archipiélagos de Azores, Madeira, Salvajes, Cabo Verde y un pequeño enclave en el continente africano, que constituyen, junto con Canarias, la región denominada Macaronesia.

En un importante número de plantas de esta flora autóctona la sabiduría tradicional ha atribuido propiedades medicinales (**Pérez de Paz y Hernández, 1999; Bramwell, 2004**), la mayoría de ellas referidas a dolencias o patología humanas. Son escasos, sin embargo, los estudios de investigación que se han desarrollado para constatar científicamente el efecto de dichas plantas. Además, la inmensa biodiversidad vegetal de las Islas Canarias sigue estando inexplorada en este área del

conocimiento por lo que la posibilidad de encontrar principios activos y/o extractos aplicables en producción animal es una alternativa muy prometedora, más si cabe teniendo en cuenta que los hallazgos que se realicen en este marco de la biodiversidad vegetal también podrían ser aplicados en medicina humana. Hay que añadir que la importancia de este tipo de estudios recae, no exclusivamente en la posibilidad de demostrar el efecto terapéutico de la planta, la determinación y análisis de los compuestos a los que se adscriben sus propiedades, o la elucidación de los mecanismos intrínsecos de actuación, sino también en la posibilidad de subrayar el interés y potencialidad que supone rescatar el conocimiento popular en etnobotánica, conservar la diversidad florística de una región y mantener un desarrollo agroecológico sostenible en nuestro entorno.

En las Islas Canarias, tanto especies de la flora endémica, como algunas especies introducidas, componen la farmacia local de plantas. Aunque las plantas medicinales fueron seguramente usadas por los habitantes originales de las Islas Canarias no parece haber archivos escritos acerca de ellas, pero sí evidencias del uso de especies locales como el drago (*Dracaena draco*), la leñabuena (*Neochamaelaea pulverulenta*), la ruda (*Ruta oreojasme*) y el mocán (*Visnea mocanera*). Algunas, como el *Aloe vera*, probablemente llegaron con los comerciantes y marineros árabes o fenicios. Muchas de las hierbas, usadas todavía de forma tradicional en las Islas Canarias, fueron introducidas por los primeros colonos y se utilizan en toda la región mediterránea; la caléndula, el romero y el hinojo sirven como ejemplos. Otras, aunque son endemismos locales, fueron usadas debido a su parentesco con plantas conocidas de los colonizadores, tales como la ruda, la lavanda y varias de las mentas (**Bramwell, 2004**).

El presente trabajo se ha centrado en el estudio de las propiedades antiparasitarias de la *Ruta pinnata*, también conocida como ruda salvaje o tederá salvaje. Esta planta, autóctona de Canarias, pertenece a la familia de las rutáceas y se encuentra de forma esporádica en la isla de Tenerife y La Palma. Son tales sus propiedades que incluso se ha usado para el tratamiento de la alopecia. Estas propiedades se encuentran principalmente en las hojas y frutos, que se pueden utilizar a modo de infusión, cataplasmas, vino o aceite de ruda (**Pérez de Paz y Hernández, 1999**).

# Material y Métodos

---



## 4.1. MATERIAL VEGETAL

### 4.1.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

La planta fundamental seleccionada para los ensayos fue *Ruta pinnata*, una especie endémica de Canarias perteneciente a la familia Rutaceae.

La selección del material vegetal se realizó en base al saber popular en etnoveterinaria de “yerberos” (personas, generalmente de avanzada edad, que conocen y aplican remedios medicinales utilizando plantas). También se tomaron en consideración algunas referencias bibliográficas que atribuían propiedades medicinales a las Rutáceas (**Guarrera, 1999; Pollio et al., 2008**). A partir de esta información, se evaluó la actividad antiparasitaria de dos especies de la familia Rutaceae (*Ruta graveolens* y *Ruta pinnata*). En el *screening* preliminar también se incluyó a *Psoralea bituminosa*, con el fin de comparar los resultados con una planta de una familia diferente, empleada como forrajera por los ganaderos y a la que se han adscrito también ciertas propiedades antiparasitarias. A partir del material vegetal recogido de las diferentes plantas se prepararon diferentes extractos utilizando distintas partes de la planta y distintos disolventes.

#### 4.1.1.1 Preparación de extractos

##### 4.1.1.1.1. Obtención de extractos naturales

Las muestras de la plantas fueron recolectadas manualmente en el Jardín Botánico de Gran Canaria y en la Isla de Tenerife, y fueron enviadas al Instituto Universitario de Bioorgánica Antonio Padrón (Universidad de La Laguna, Tenerife), donde se realizó la preparación de los extractos vegetales. Las muestras se secaron en umbría a temperatura ambiente durante aproximadamente un mes, asegurando su óptima aireación para evitar infecciones con hongos y/o bacterias y evitando posibles fermentaciones. Una vez seco, el material vegetal se homogeneizó, por diferentes métodos, para obtener una muestra uniforme.

Para la extracción de los extractos bioactivos presentes en las plantas de las especies *R. pinnata*, *R. graveolens* y *P. bituminosa*, se emplearon muestras de la parte aérea de las mismas, tomando plantas maduras en distintos estadios de fructificación. Una vez que las muestras estuvieron secas y homogeneizadas, se procedió a la extracción metanólica de los compuestos activos. La metodología utilizada para esta extracción fue similar a la usada por otros autores para la obtención de extractos de *Pancreatium canariensis* (**Cedron et al., 2009**) y *Pricamnia antidesma* (**Solis et al., 1995**).

Para la extracción de los compuestos orgánicos de las plantas de forma individual, aproximadamente 750 g del material vegetal se empaquetaron en bolsas de papel de filtro y se introdujeron en una columna de un equipo Soxhlet con 5,5 litros de disolvente; la extracción se realizó en caliente hasta el agotamiento. Para la extracción acuosa, la biomasa homogeneizada se hirvió en agua destilada y luego se filtró para

eliminar los restos vegetales. Al finalizar la extracción, los extractos bioactivos obtenidos se secaron al vacío utilizando un rota-vapor sobre un baño de agua.

También se realizó la extracción de los extractos bioactivos presentes en frutos con distintos grados de maduración de las plantas *R. pinnata* y *R. graveolens*. Para ello, se tomaron aproximadamente 70 g de frutos y se homogeneizaron tras congelarlos en nitrógeno líquido, con el fin de disgregarlos y así realizar una extracción más efectiva. El homogeneizado se empaquetó en sobres de papel que se introdujeron en una columna de un equipo Soxthel y la extracción se realizó hasta el agotamiento usando un volumen de disolvente orgánico de 1,5 litros, de forma similar a como se indicó para los extractos de la parte aérea de la planta entera. En primer lugar, se realizó una extracción usando metanol como disolvente. Una vez seco, dicho extractos mostraba un aspecto aceitoso (sobrenadante) además de una parte semisólida (*pellet*); ambas partes se separaron por decantación y con asistencia de una ligera centrifugación. La parte semisólida se disolvió en agua, obteniéndose así un extracto acuoso de los mismos. Además, parte de esta disolución fue sometida a una extracción líquido-líquido empleando los siguientes disolventes: hexano, cloroformo y acetato de etilo.

#### 4.1.1.1.2. Obtención de cultivos *in vitro* de *Ruta pinnata*

Debido a la poca disponibilidad de biomasa vegetal de *R. pinnata*, y por tratarse de una especie protegida, se evaluó la posibilidad de obtener material vegetal mediante cultivos *in vitro* de la planta. Los cultivos se iniciaron tomando fragmentos de tejidos de plántulas crecidas bajo condiciones de asepsia en frascos traslúcidos en medio sólido Murashige-Skoog, 3 % de sacarosa. Los fragmentos se cultivaron en diferentes medios nutritivos para estimular el crecimiento de las células, agregados celulares, tejidos, brotes, etc. empleando el medios MS, bien solidificado con agar al 0,8 % o medio líquido, conteniendo además 3 % de sacarosa y suplementado con reguladores de crecimiento, tales como auxina (NAA, 2-4-D) y distintas citoquininas (BAP) a diferentes concentraciones. El pH fue ajustado antes de autoclavar a 1 atmósfera de presión, 115 °C durante 15 min. Todos los fragmentos se cultivaron e incubaron en una cámara de cultivo a 25 °C y 16 horas de luz blanca. Los fragmentos cultivados en medio nutritivo líquido se incubaron en un agitador a 95 rpm.

A partir del material vegetal obtenido *in vitro*, los agregados que mostraron cierto grado de diferenciación celular, color verde y en ocasiones yemas o brotes, así como callos, se cultivaron en 3 medios nutritivos que se diferenciaron en el contenido de reguladores del crecimiento que contenían, el medio MSe ( 6 mg/L NAA + 1 mg/L BAP), el MS3 (0,5 mg/L + 1 mg/L BAP) y el MS6 (2 mg/L NAA + 4 mg/L 2,4-D + 1 mg/L BAP). Se dispensaron aproximadamente 2 g de agregado vegetal en matraces de 500 ml con 100 ml de medio nutritivo. Todos ellos se incubaron en agitación (95 rpm) bajo las condiciones de cultivo mencionadas anteriormente.

A partir del material vegetal obtenido *in vitro* de los medios MSe, MS6 o MS3 se realizó una extracción con metanol y a continuación una segunda extracción con diferentes disolventes: hexano, acetato de etilo, cloroformo y agua. En los ensayos de

actividad antiparasitaria frente a nematodos y coccidios se utilizaron tanto los extractos metanólicos como sus fracciones.

#### 4.1.1.2. Dilución de extractos

Para la realización de los ensayos *in vitro*, los extractos obtenidos fueron diluidos a diferentes concentraciones en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) a concentraciones que no afectasen la viabilidad de los parásitos. La concentración final máxima de DMSO que se utilizó para disolver los distintos extractos fue del 6 %. Extracto y disolvente se mezclaron hasta que la disolución fue homogénea a la concentración final de trabajo elegida para cada ensayo y cada extracto. A partir de la solución inicial se obtuvieron las siguientes diluciones, como se comentará en el apartado correspondiente. Todos los compuestos utilizados en los ensayos de presente estudio se muestran en la **Tabla 1**.

PROCEDENCIA DEL EXTRACTO	DISOLVENTE UTILIZADO EN LA EXTRACCIÓN	ABREVIATURA/ NOMENCLATURA USADA EN EL TRABAJO
Parte aérea de planta de <i>Ruta pinnata</i>	Metanol	MeOH Rp
Parte aérea de planta de <i>Ruta graveolens</i>	Metanol	MeOH Rg
Parte aérea de planta de <i>Psoralea bituminosa</i>	Metanol	MeOH Pb
Frutos maduros de <i>Ruta pinnata</i>	Metanol	MeOH FrM Rp
Frutos maduros de <i>Ruta pinnata</i>	Metanol	CM-481
Frutos maduros de <i>Ruta pinnata</i> (extracto metanólico)	Hexano	MeOH + Hx FrM Rp
Frutos maduros de <i>Ruta pinnata</i> (extracto metanólico)	Cloroformo	MeOH + Cl FrM Rp
Frutos maduros de <i>Ruta pinnata</i> (extracto metanólico)	Acetato de etilo	MeOH + Ac FrM Rp
Frutos maduros de <i>Ruta pinnata</i>	Agua	Aq FrM Rp
Frutos verdes de <i>Ruta pinnata</i> (Extracto metanólico)	Hexano	MeOH + Hx FrV Rp
Frutos verdes de <i>Ruta pinnata</i> (Extracto metanólico)	Acetato de etilo	MeOH + Hx FrV Rp
Frutos verdes de <i>Ruta pinnata</i>	Agua	Aq FrV Rp
Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Ruta pinnata</i> en medio MS6	Metanol	CM-472
Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Ruta pinnata</i> en medio MSe	Metanol	MeOH CM-134
Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Ruta pinnata</i> en medio MS6 + MS3	Metanol	MeOH CM-135
Extracto <i>in vitro</i> de <i>Ruta pinnata</i> en medio MS6	Metanol	MeOH CM-463.1
Extracto <i>in vitro</i> CM-463.1	Hexano	MeOH CM-466.1 + Hx
Extracto <i>in vitro</i> CM-463.1	Cloroformo	MeOH CM-467.1 + Cl
Extracto <i>in vitro</i> CM-463.1	Acetato de etilo	MeOH CM-468.1 + Ac
Extracto <i>in vitro</i> CM-463.1	Agua	MeOH CM-469.1 + Aq

**Tabla 1.** Relación de extractos, naturales e *in vitro*, disolventes utilizados y abreviatura/ nomenclatura, utilizados en los ensayos para la evaluación de la actividad antiparasitaria.

## 4.2. ANIMALES

### 4.2.1. ANIMALES DONANTES DE *HAEMONCHUS CONTORTUS*

Se utilizaron ovejas de raza Canaria de unos 6 meses de edad como donantes de vermes adultos, huevos y larvas infectantes de *Haemonchus contortus* (*H. contortus*). Los animales se mantuvieron en un ambiente libre de nematodos en las instalaciones de la Granja Agrícola Experimental del Cabildo de Gran Canaria, situada en el municipio de Arucas en las proximidades de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Dichas instalaciones fueron previamente limpiadas y desinfectadas. Antes de la inoculación de los animales, se analizó el estado parasitario de los mismos. Para ello se tomaron heces directamente de recto y se analizaron mediante la técnica de concentración por flotación en solución saturada de cloruro sódico. Se observaron huevos de *Strongyloides papillosus*, por lo que se desparasitaron con Levamisol (Cyver) a una dosis de 1 ml/10 k.p.v. Después de dos semanas se comprobó que los animales estaban libres de nematodos y en este momento se llevó a cabo la infección.

Todos los animales se inocularon vía intra-ruminal con 7000 L3 infectantes de una cepa de *H. contortus* adaptada al caprino, que fue cedida por del Dr. Ignacio Ferré (Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid). A partir de la segunda semana de infección se realizó un chequeo coprológico diario de los animales para determinar el comienzo de la eliminación de los huevos, para lo cual se utilizó el método de concentración por flotación en solución saturada de cloruro sódico. Una vez constatada la presencia de huevos, se empezó a recoger heces diariamente para la obtención de larvas de tercer estado y huevos.

### 4.2.2. ANIMALES DONANTES DE *EIMERIA NINAKOHLIYAKIMOVAE*

Se utilizaron cabritos lactantes de raza Majorera como donantes de ooquistes del coccidio *Eimeria ninakohlyakimovae* (*E. ninakohlyakimovae*).

Los animales, que cuando llegaron al animalario tenían 1 o 2 días de edad, se sumergieron parcialmente en agua tibia con lejía comercial diluida para eliminar todos los restos de heces adheridos a las pezuñas y región perianal, así como el polvo de entre el pelo, todo ello con el fin de evitar posibles contaminaciones a posteriori con especies de *Eimeria* exógenas, diferentes a la cepa de *E. ninakohlyakimovae*. A continuación se secaron y se distribuyeron en jaulas esterilizadas por calor que se alojaron en el animalario ubicado en las instalaciones de la Facultad de Veterinaria de La Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Los boxes utilizados fueron previamente limpiados y desinfectados con lejía. Antes de la inoculación de los animales se les desparasitó con diclazuril (Vecoxan, Janssen-Cilag®) y halofunginona (Halocur, Intervet®) para minimizar el riesgo de contagio no deseado con *Eimeria* y *Cryptosporidium*, respectivamente. El tratamiento con diclazuril se realizó el día de la recepción de los animales y a la semana siguiente, y la halofunginona se administró

durante los primeros siete días. Los cabritos se inocularon a las cuatro semanas de edad. El día anterior a la inoculación se comprobó que los animales estaban libres de parásitos, para lo cual se tomaron muestras de heces directamente del recto y se analizaron mediante la técnica de concentración por flotación en solución saturada de cloruro sódico.

Todos los animales se inocularon vía oral con 200000 ooquistes esporulados de *E. ninakohlyakimovae*, previamente conservados a 4 °C en dicromato potásico al 2 % (Panreac) durante no más de seis meses. A partir de los 12-13 días se realizó un chequeo coprológico diario de los animales para determinar el comienzo de la eliminación de ooquistes, para lo cual se utilizó el método de concentración por flotación en solución saturada de cloruro sódico. Una vez constatada la presencia de ooquistes, se empezó a recoger heces diariamente durante una semana.

### **4.3. PARÁSITOS**

#### **4.3.1. RECOLECCIÓN, PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE HUEVOS DE *H. CONTORTUS***

Para la obtención de huevos, se recogieron heces de los animales infectados en pequeños cubos y se disgregaron con solución saturada de NaCl con densidad 1,19 g/l. La mezcla se filtró posteriormente por mallas de poro decreciente para eliminar el detritus y obtener una solución de huevos relativamente limpia. Utilizando esta solución, se realizó una flotación en recipientes de plástico de aproximadamente 20 x 20 x 15 durante no más de 20 min para que la solución de sal no afectara a la viabilidad de los huevos. Transcurrido este tiempo, se retiró el cristal que cubría el recipiente y se lavó la cara en contacto con el líquido con abundante agua destilada. Para eliminar todos los restos de sal, la solución de huevos obtenida se lavó 3 veces con agua destilada mediante sedimentación lenta en tubos de Falcon de 50 ml durante 30 min. La determinación del número de huevos en el concentrado resultante se determinó mediante la técnica de McMaster modificada (Sloss *et al.*, 1994).

#### **4.3.2. OBTENCIÓN, CONCENTRACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LARVAS 3 DE *H. CONTORTUS***

Con el objeto de crear condiciones favorables para el desarrollo larvario, las heces recogidas de los animales inoculados se mezclaron en un recipiente con turba estéril en relación 1/3 aproximadamente (una parte de turba y tres de heces) y se humedecieron con agua hasta conseguir una mezcla homogénea con un grado de humedad alto, aunque procurando que no hubiese exceso de líquido. Para evitar la contaminación vehiculada por artrópodos y facilitar al mismo tiempo la aireación, los cultivos se cubrieron con una tela tipo tul sellada con un elástico. Las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente durante alrededor de 12 días. Durante ese tiempo, y con una frecuencia de 48 horas, el material fecal se volteó para facilitar la aireación

de las capas más profundas del cultivo y minimizar el crecimiento de hongos, añadiendo agua, en caso necesario, para mantener el grado de humedad óptimo.

Las larvas infectantes (L3) se obtuvieron mediante el método de Baermann. El material cultivado se colocó sobre una rejilla en un embudo en el que se añadió agua destilada hasta cubrir la parte inferior del material fecal. Transcurridas 24 horas a temperatura ambiente, el líquido del embudo se recogió en una copa de decantación para proceder a la concentración y purificación de las larvas. Con esta finalidad, el líquido recogido del embudo se mantuvo a 4 °C durante aproximadamente 24 horas para que las larvas sedimentaran en el fondo. Transcurrido este tiempo, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se transfirió y se dejó secar en un papel de filtro durante 24 horas a temperatura ambiente. Una vez seco el papel de filtro se depositó en una copa de decantación con agua limpia y se mantuvo en esta posición durante 24 horas a la misma temperatura; de esta forma se conseguía que las larvas migraran hacia el agua desprendiéndose del papel y que el detritus quedara adherido al filtro. Una vez limpias, las larvas se concentraron mediante decantación y frío de la forma descrita anteriormente y el sedimento con larvas limpias y concentradas se conservó en frascos de cultivo de fondo plano a 4 °C hasta su uso. Para favorecer la viabilidad y vitalidad de las larvas el agua se renovó cada 2-3 días (**Fleck y Moody, 1988; MAFF, 1989; Colville, 1991**).

La determinación de la concentración de larvas se realizó en base a la media obtenida en los recuentos de alícuotas de 20 µl extraídas del volumen total del líquido, previamente mantenido a temperatura ambiente 24 horas para favorecer la activación larvaria. En el recuento solamente se consideraron las larvas que mostraban movilidad (**MAFF, 1989**).

#### **4.3.3. RECOGIDA Y PURIFICACIÓN DE VERMES DE *H. CONTORTUS***

La técnica utilizada para la recogida de adultos de *H. contortus* se basa en la capacidad de los vermes para migrar activamente desde una película semisólida de agar hacia una solución de PBS mantenida a 38 °C. El material empleado en la técnica y la metodología seguida se describen a continuación.

Se cortaron paños de teflón de manera que su tamaño se ajustase al fondo de bandejas de plástico de aproximadamente 40 x 20 cm (un total de 10-12 bandejas por abomaso). Se dejó largo el extremo que ha de conectar con la barra soporte para que se pudiese fijar bien a ella mediante pinzas. La longitud real del paño tenía que ser inferior a la del tanque de incubación que contenía el PBS a 38 °C, para que los vermes pudieran migrar al fondo. Una vez fijados los paños a los soportes de madera con pinzas, el conjunto se dispuso en las bandejas ajustando el paño completamente al fondo para evitar que se formaran pliegues; para ello se sumergió previamente el paño en agua tibia, se escurrió y se amoldó luego al fondo de la bandeja. Se preparó suficiente PBS 0,01 M para llenar el tanque y se mantuvo a 38 °C (unos 5 litros por tanque y dos tanques por abomaso). La temperatura de la estufa donde se colocaron las urnas se mantuvo a 42 °C para que, al abrir y cerrar, no disminuyese la temperatura por debajo de los 38 °C. Además de estos materiales, para cada abomaso se

prepararon 14 g de agar (Sigma-Aldrich), 700 de agua destilada próximos a ebullición y 700 ml de agua a 38 °C.

Antes del sacrificio de los animales, fue necesario mantenerlos en ayuno entre 24-35 horas con el fin de minimizar la presencia de contenido gástrico. Tras el sacrificio se ligó fuertemente el abomaso por ambos extremos con una cuerda, se identificó convenientemente, se introdujo en una bolsa de plástico y a continuación se pasó a una nevera-termo que contenía agua a unos 40 °C para que se mantuviese en lo posible a temperatura corporal hasta su llegada al laboratorio, que se realizó de la manera más rápida posible. Una vez los abomasos llegaron al laboratorio, se añadieron los 14 g de agar a los 700 ml de agua destilada próximos a ebullición y se siguió calentando y agitando hasta que mezcla hirvió al menos tres veces consecutivas. Se enfrió entonces la mezcla en hielo, agitando con frecuencia y comprobando la temperatura hasta que la mezcla alcanzó los 43 °C. Cuando la temperatura del agar líquido estuvo próxima a esta temperatura, se colocó el abomaso en una bandeja y se abrió por la curvatura mayor. A continuación, se lavó la mucosa del abomaso con agua a 38 °C (hasta 700 ml) tratando de recoger el mayor número de vermes posibles. El lavado se mezcló con el agar líquido, dispensando rápidamente la mezcla resultante en las bandejas de manera que formase una fina capa que cubriese todo el paño.

Cuando el agar se solidificó, los paños se colocaron rápidamente en el tanque con PBS, manteniendo el conjunto en la estufa una hora y media como mínimo con el objeto de que los vermes se desprendiesen del agar y pasasen al PBS. Durante este tiempo se prepararon placas de Petri, así como lancetas, y se mantuvo una placa caliente a 38 °C. Transcurrida una hora y media, se retiraron los paños de la estufa, comprobando que estuviesen libres de vermes. Tras desechar el PBS sobrenadante del tanque, el sedimento con vermes se recogió en un vaso de precipitado, desde donde se fueron transfiriendo pequeñas cantidades de PBS y vermes a placas de Petri de plástico que se mantenían a 38 °C sobre la placa caliente. A continuación se recogieron los adultos con lancetas y se conservaron en medio RPMI (Sigma-Aldrich) a 37 °C hasta la realización de los ensayos.

#### **4.3.4. OBTENCIÓN DE OOQUISTES DE *E. NINAKOHLIYAKIMOVAE***

Para la obtención de ooquistes se recogieron heces de los animales infectados en bolsas que se conservaron a 4 °C. A continuación, las heces se lavaron con agua y se filtraron sobre un embudo con mallas de poro decreciente con el fin de disminuir la cantidad de detritus. La solución resultante se dispensó en envases de plástico sin tapa con solución concentrada de azúcar con densidad 1,5 g/l en una relación 1:1 v/v de forma que se formara un menisco sobre ellos. Los recipientes se cubrieron con cristales con el fin de que los ooquistes, al flotar, quedaran adheridos a la cara inferior de los mismos. Cada dos horas, se procedía al lavado de los cristales recogiendo así los ooquistes y, a continuación, se agitaba suavemente la mezcla, se rellenaba con solución de azúcar si era preciso y se colocaba de nuevo el cristal. Cada lote de flotaciones se mantuvo durante 3 días seguidos; mientras tanto, los ooquistes recogidos se guardaron a 4 °C.

Para los ensayos de esporulación de ooquistes se utilizaron ooquistes no esporulados. En tal caso, una vez recogidos mediante el método de flotación descrito anteriormente, los ooquistes se purificaron y concentraron inmediatamente por medio de un gradiente de Percoll, técnica que se explicará en los apartados siguientes. El resto de ooquistes se diluyó en dicromato potásico al 2 % en matraces Erlenmeyer en los que se sumergía un dispositivo electrónico para la aireación del líquido con el fin de favorecer la esporulación. Después de una semana a temperatura ambiente, los ooquistes ya esporulados se lavaron y concentraron por centrifugación y, finalmente, se dispensaron en botellas de cultivo con filtro en una solución de dicromato potásico 2 % (Panreac). Las botellas se conservaron en refrigeración a 4 °C hasta que se llevó a cabo el aislamiento de esporozoítos.

#### **4.3.5. PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE OOQUISTES NO ESPORULADOS**

Los ooquistes que se recogieron de las flotaciones en solución de azúcar se purificaron utilizando gradientes de Percoll con el fin de separar el detritus de los ooquistes. Volúmenes de 20 ml de solución de ooquistes se dispensaron en tubos de 50 ml que se terminaron de llenar con agua destilada. Esta mezcla se centrifugó a 1500 x *g* durante 5 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se mezcló otra vez con agua para realizar un nuevo lavado, así hasta 5 veces. Después del último lavado, el sedimento resultante se llevó hasta 20 ml con agua destilada y se mezcló con 60 ml de hipoclorito sódico al 5 % (Panreac) en un envase de cristal sellado con film y en oscuridad. A continuación, la mezcla se agitó durante 20 min en oscuridad a 4 °C y la solución resultante se transfirió a tubos de 50 ml (40 ml y 40 ml), realizándose seguidamente una centrifugación a 250 x *g* durante 5 min. Tras esta centrifugación lenta, se recogió el sobrenadante en un nuevo tubo de 50 ml se procedió a realizar un total de 5 lavados con agua destilada centrifugando a 1500 x *g* durante 5 min. Tras la última centrifugación, se dejó el sedimento a la cantidad justa que se requiere para dispensarla en los gradientes de Percoll, normalmente 1,5 ml de solución de ooquistes.

Se utilizaron dos gradientes continuos de Percoll, del 60 y 50 % (Percoll™GE Healthcare), preparados según se muestra en la siguiente tabla. La realización del gradiente propiamente dicho se realizó mediante centrifugación de la correspondiente mezcla a 27000 x *g* durante 20 min en una ultracentrífuga (Beckman Coulter Optima™ L-100 Xp Ultracentrifuge).

SOLUCIÓN	REACTIVOS	CANTIDAD (ml)
<b>SOLUCIÓN 1</b>	Percoll	9
	NaCl 1,5M	1
<b>SOLUCIÓN 2</b>	NaCl 1,5M	10
	dH <sub>2</sub> O	90
<b>SOLUCIÓN DE PERCOLL 50%</b>	Solución 1	5
	Solución 2	5
<b>SOLUCIÓN DE PERCOLL 60%</b>	Solución 1	6
	Solución 2	4

**Tabla 2.** Reactivos y soluciones utilizados en los gradientes de Percoll.

De forma rutinaria, se preparaban 7 ml de cada gradiente. Una vez preparados los gradientes se dispensaban cuidadosamente 1,5 ml de la solución de ooquistes sobre los tubos que contenían el gradiente del 50 % y se centrifugaba a 400 x g durante 20 min a 4 °C, con desaceleración 0 y aceleración 0. Después de esta centrifugación se obtenían unas bandas que separaban parcialmente los ooquistes del detritus. Utilizando una pipeta Pasteur de vidrio se recogía la banda de ooquistes y se transfería a un tubo de 50 ml. Estos ooquistes se concentraban para, a continuación, añadirlos sobre el gradiente del 60 %, repitiéndose el mismo proceso descrito anteriormente.

Una vez terminada la correspondiente centrifugación, se recogieron de igual forma los ooquistes limpios, se concentraron y se contaron utilizando una cámara de Newbauer.

#### **4.3.6. OBTENCIÓN DE ESPOROZOÍTOS DE *E. NINAKOHLIYAKIMOVAE***

Para la obtención de esporozoítos se utilizaron ooquistes esporulados, los cuales se purificaron y concentraron mediante la técnica de separación con gradientes de Percoll descrita anteriormente.

Una vez obtenidos los ooquistes limpios, se dispensaron de 2 a 3 ml en una botella de cultivo sin filtro junto a 20-25 ml de L-cisteína, preparada según se indica en la **Tabla 3**, esta solución fue esterilizada por medio de filtros de 0,22 µm antes de ser utilizada. Antes de cerrar la botella se añadió CO<sub>2</sub> durante 30 segundos y se cerró rápidamente. La mezcla de ooquistes se incubó durante la noche (aproximadamente 16 horas) a 37 °C y una atmósfera del 5 % de CO<sub>2</sub>.

REACTIVOS	CANTIDAD
L-cisteína (Merck)	0,35 g
NaHCO <sub>3</sub> (Scharlau)	1,68 g
dH <sub>2</sub> O	100 ml

**Tabla 3.** Reactivos empleados en la preparación de la solución de L-Cisteína

Al día siguiente, se transfirió el contenido de la botella a un tubo de 50 ml. La botella se lavó con la misma solución de L-cisteína preparada el día anterior y el resultado del lavado se añadió al mismo tubo de 50 ml. La mezcla se centrifugó a 1500 x *g* durante 5 min y el sedimento se transfirió a una botella de cultivo con filtro junto a una solución de desenquistamiento con tripsina (**Tabla 4**). La mezcla se incubó durante 3 horas a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 %. Transcurrido este tiempo, y tras observar suficientes esporozoítos libres, éstos se recogieron en tubos de 50 ml y se lavaron mediante 3 centrifugaciones consecutivas a 1500 x *g* durante 20 min con medio RPMI. Después del último lavado, los esporozoítos se recogieron, se concentraron y se contaron en una cámara de Newbauer.

REACTIVOS	CANTIDAD
Tripsina (Trypsin 1:250, Serva)	0,12 g
Solución de Hank's 10% (Hank's salt solution 10x, Sigma®)	2,76 ml
Bilis bovina	2,4 ml
dH <sub>2</sub> O	24,84 ml

**Tabla 4.** Reactivos empleados en la preparación de la solución de tripsina.

#### 4.3.7. CÉLULAS HOSPEDADORAS

Se utilizaron células epiteliales de colon de la especie bovina (BCEC) inmortalizadas que fueron donadas por el Instituto de Parasitología de la Justus-Liebig University de Giessen, Alemania. Esta línea celular fue inicialmente aislada de las criptas del colon de la especie bovina (**Föllman *et al.*, 2000**) y posteriormente inmortalizadas por lipofección con el plásmido pSVneo3 que codifica el antígeno SV40 T grande, tal y como describieron **Pauly *et al.* (1995)**. En un primer momento, las células se hicieron crecer en botellas de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> (Nunc) y, cuando estuvieron confluentes, se dividieron y se sembraron en placas de 12 pocillos (Nunc)

durante 3 días hasta que estuvieron nuevamente confluentes y listas para la infección con los esporozoítos. Para su incubación se usó medio RPMI 1640 (Sigma®) con 1 % penicilina-estreptomicina (Sigma®), 5 % suero fetal bovino (Linus) y plasmocín (Plasmocin™ 50 mg-25 mg/ml, Invitrogen), este último compuesto para evitar la contaminación por micoplasmas.

#### **4.4. ENSAYOS *IN VITRO* CON NEMATODOS**

##### **4.4.1. ENSAYOS DE ECLOSIÓN DE HUEVOS (EEH)**

El test EEH se realizó siguiendo las recomendaciones de la “World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology” (W.A.A.V.P) para determinar la resistencia antihelmíntica (Coles et al., 1992) con ligeras modificaciones para el ensayo con productos naturales. Como tratamientos activos se utilizaron los extractos obtenidos de la planta seleccionada, como control positivo el antihelmíntico de efecto ovicida oxibendazol (Oxibendaziven, Laboratorios Iven) y como control negativo huevos no tratados diluidos en las correspondientes concentraciones de DMSO (Sigma). Las concentraciones empleadas para cada caso están recogidas en la **Tabla 5**. El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos añadiendo en cada uno de ellos 100 µl de una suspensión con aproximadamente 150-200 huevos, a los cuales se añadió 100 µl de las distintas concentraciones de extracto, control positivo o DMSO. Tras incubar a 28 °C durante 24 horas, se determinó el porcentaje de a) huevos no larvados, b) huevos larvados, c) larvas inmóviles y d) larvas móviles mediante observación al microscopio (Olympus CK X 41). Se consideró que existía actividad ovicida propiamente dicha cuando el extracto era capaz de evitar que los huevos iniciasen el proceso de desarrollo larvario (huevos no embrionados), y actividad larvicida cuando el desarrollo larvario se iniciaba pero se detenía en algún punto (huevos larvados y larvas inmóviles). Las muestras se analizaron por triplicado dentro de cada ensayo y se realizaron dos ensayos idénticos en diferentes días.

<b>Extractos (mg/ml)</b>	<b>Control positivo Oxibendazol (µg/ml)</b>	<b>Control negativo DMSO (%)</b>
<b>5</b>	1250	3
<b>1,25</b>	125	1,5
<b>0,31</b>	12,5	0,75
<b>0,08</b>	1,25	0,375
<b>0,02</b>	0,125	0,1875

**Tabla 5.** Concentraciones finales utilizadas en los ensayos de EEH para los extractos de *Ruta pinnata* (planta), *P. bituminosa* (planta), *R. graveolens* (planta), extracto metanólico de frutos maduros de *Ruta pinnata*. También se recogen en la tabla las concentraciones del control positivo (oxibendazol) y del control negativo (DMSO).

#### 4.4.2. ENSAYOS DE DESARROLLO LARVARIO (EDL)

Antes de la realización del ensayo se hicieron pruebas de estandarización, donde se probaron diferentes condiciones con el fin de obtener la más adecuada para completar el desarrollo larvario *in vitro* de L1 a L3 de las larvas de *H. contortus*. Se utilizaron diferentes medios de cultivos (medio RPMI, medio RPMI suplementado con extracto de levadura, medio RPMI suplementado con el filtrado restante de la suspensión de huevos inicial y medio LB + *E. coli*,) con diferentes concentraciones de penicilina/estreptomicina y anfotericina B, además de distintas condiciones de incubación, en las que se varió la temperatura (28 °C o temperatura ambiente) y la aireación y humedad de las placas (Marie-Magdeleine *et al.*, 2009, Ademola *et al.*, 2011, Carvalho *et al.*, 2012, Cala *et al.*, 2014).

Una vez estandarizada la prueba se incubaron 100 µl de una suspensión de 200 huevos de *H. contortus*, obtenidos por el método anteriormente comentado, en placas de cultivo de 96 pocillos. Dicha suspensión se suplementó con 50 µl de filtrado y agua destilada estéril. Las placas se incubaron a 28 °C durante 24 horas y, transcurrido este tiempo, se comprobó que en cada pocillo hubiese un porcentaje de eclosión cercano al 80 %. Una vez alcanzado este porcentaje de eclosión, se añadieron 100 µl de las diferentes concentraciones de extracto, control negativo (DMSO, Sigma) y control positivo (Levamisol, Cyver antihelmíntico® Fort Dodge). Transcurridos 6 días de incubación a 28 °C se añadió una gota de solución de Lugol y se realizó el recuento larvario en un microscopio invertido, separando las larvas en dos tipos: larvas de tercer estadio (L3) y otros estadios larvarios (L1 y L2), con el fin de obtener la relación entre ambos.

Extractos (mg/ml)	Control positivo Levamisol (mg/ml)	Control negativo DMSO (%)
5	15	3
1,25	1,5	1,5
0,3125	0,15	0,75
0,008	0,015	0,375
0,002	0,0015	0,1875

**Tabla 6.** Concentraciones finales utilizadas en los ensayos de EDL para los extractos de *Ruta pinnata* (planta), *P. bituminosa* (planta), *R. graveolens*, extracto metanólico de frutos maduros de *Ruta pinnata*. También se recogen en la tabla las concentraciones del control positivo (levamisol) y del control negativo (DMSO).

#### 4.4.3. ENSAYOS DE PARÁLISIS LARVARIA (EPL)

Determina el porcentaje de larvas infectantes L3 paralizadas tras la incubación con diluciones seriadas del extracto. El procedimiento seguido fue similar al propuesto por Kotzte *et al.* (2004). Un volumen de 100 µl de una suspensión con aproximadamente 150-200 L3 se mezclaron con concentraciones conocidas de los correspondientes extractos en placas de 96 pocillos y se incubaron a temperatura ambiente durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se realizó una primera lectura de

los pocillos calculando el porcentaje de larvas móviles e inmóviles. Como control positivo se incluyó el antihelmíntico levamisol y, como control negativo, DMSO a las correspondientes concentraciones.

Se consideró que las larvas estaban completamente inmóviles cuando no se observaba movimiento durante 5 segundos de observación. Las muestras se analizaron por triplicado dentro de cada ensayo y se realizaron dos ensayos idénticos de diferentes días.

<b>Extractos (mg/ml)</b>	<b>Control positivo Levamisol (mg/ml)</b>	<b>Control negativo DMSO (%)</b>
<b>12,5</b>	37,5	3
<b>6,25</b>	3,75	1,5
<b>3,125</b>	0,375	0,75
<b>0,625</b>	0,01875	0,375
<b>0,0625</b>	0,00093	0,234

**Tabla 7.** Concentraciones finales utilizadas en los ensayos de EPL para los extractos de *Ruta pinnata* (planta), *P. bituminosa* (planta), *R. graveolens* (planta). También se recogen en la tabla las concentraciones del control positivo (levamisol) y del control negativo (DMSO).

<b><i>Ruta pinnata</i> (mg/ml)</b>	<b>Control positivo Levamisol (mg/ml)</b>	<b>Control negativo DMSO (%)</b>
<b>12,5</b>	37,5	1,5
<b>6,25</b>	3,75	0,75
<b>3,125</b>	0,375	0,375
<b>0,625</b>	0,01875	0,075
<b>0,0625</b>	0,00093	0,0075
<b>0,03125</b>		0,00375
<b>0,01562</b>		0,0018

**Tabla 8.** Concentraciones finales utilizadas en los ensayos de EPL para el extractos de *R. pinnata* (extracto metanólico de parte aérea de planta fructificada). También se recogen en la tabla las concentraciones del control positivo (levamisol) y del control negativo (DMSO).

<b>Extractos (mg/ml)</b>	<b>Control positivo Levamisol (mg/ml)</b>	<b>Control negativo DMSO (%)</b>
<b>25</b>	37,5	3
<b>12,5</b>	3,75	1,5
<b>6,25</b>	0,375	0,75
<b>3,125</b>	0,01875	0,15
<b>0,625</b>	0,00093	0,015
<b>0,0625</b>		0,0015

**Tabla 9.** Concentraciones finales utilizadas en los ensayos de EPL para los extractos metanólicos de frutos maduros de *Ruta pinnata* sujetos a una segunda extracción con diferentes disolventes orgánicos (hexano, acetato de etilo, cloroformo, agua). También se recogen en la tabla las concentraciones del control positivo (levamisol) y del control negativo (DMSO).

Extractos (mg/ml)	Control positivo Levamisol (mg/ml)	Control negativo DMSO (%)
25	37,5	3
12,5	3,75	1,5
6,25	0,375	0,75
3,125	0,01875	0,15
0,625	0,00093	0,015
0,0625		0,0015

**Tabla 10.** Concentraciones finales utilizadas en los ensayos de EPL para los extractos metanólicos de frutos verdes de *Ruta pinnata* sujetos a una segunda extracción con diferentes disolventes orgánicos (hexano, acetato de etilo y agua). También se recogen en la tabla las concentraciones del control positivo (levamisol) y del control negativo (DMSO).

Productos (mg/ml)	Control positivo Levamisol (mg/ml)	Control negativo DMSO (%)
25	37,5	3
12,5	3,75	1,5
6,25	0,375	0,75
3,125	0,01875	0,15
0,625	0,00093	0,015
0,0625		0,0015

**Tabla 11.** Concentraciones finales utilizadas en los ensayos de EPL para los compuestos bioactivos elaborados a partir de cultivos *in vitro* de *R. pinnata* (CM-134 y CM-135). También se recogen en la tabla las concentraciones del control positivo (levamisol) y del control negativo (DMSO).

Productos (mg/ml)	Control positivo Levamisol (µg/ml)	Control negativo DMSO (%)
3	37,5	3
0,6	3,75	0,6
0,2	0,375	0,2
0,12	0,01875	0,12
0,03	0,00093	0,03
0,006	37,5	0,006

**Tabla 12.** Concentraciones finales utilizadas en los ensayos de EPL para los productos elaborados a partir de cultivos *in vitro* de *R. pinnata* (CM-466.1, CM-463.1, CM-467.1, CM-468.1, CM-469.1). También se recogen en la tabla las concentraciones del control positivo (levamisol) y del control negativo (DMSO).

#### 4.4.4. ENSAYOS DE VIABILIDAD DE ADULTOS (EVA)

Cuantifica el porcentaje de adultos viables de *H. contortus* tras el contacto de los vermes con las diferentes concentraciones de extracto. El ensayo se realizó siguiendo las recomendaciones descritas por **Sharma et al. (1971)**. Los vermes

maduros recogidos del abomaso con el método explicado anteriormente, se suspendieron en medio RPMI-1640 con 1 % penicilina-estreptomicina (P/E) a una concentración de 10 vermes/ml (5 hembras y 5 machos) y se incubaron en placas de 12 pocillos a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> con diferentes diluciones de extracto, control positivo (levamisol) y negativo (DMSO). Se determinó la movilidad de los vermes a las 24 horas de incubación. Se realizaron seis determinaciones de cada condición en el mismo día.

Extractos (mg/ml)	Control positivo Levamisol (µg/ml)	Control negativo DMSO (%)
25	1500	3
5	300	0,6
1	60	0,12
0,25	12	0,03

**Tabla 13.** Concentraciones finales utilizadas en los ensayos de EVA para el extracto metanólico de frutos maduros de *R. pinnata* y de los extractos metanólicos procedentes de planta entera de *R. pinnata*, *P. bituminosa* y *R. graveolens*. También se representan en la tabla las concentraciones del control positivo (levamisol) y control negativo (DMSO).

Producto (mg/ml)	Control positivo Levamisol (µg/ml)	Control negativo DMSO (%)
12,5	750	1,5
6,25	150	0,75
3,125	30	0,375
0,625		0,075
0,0625		0,0075

**Tabla 14.** Concentraciones finales utilizadas en los ensayos de EVA para los productos elaborados a partir de cultivos *in vitro* de *R. pinnata* (CM-134 y CM-135). También se representan en la tabla las concentraciones del control positivo (levamisol) y control negativo (DMSO).

## 4.5. ENSAYOS *IN VITRO* CON COCCIDIOS

### 4.5.1. ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LA ESPORULACIÓN (EIE)

Este test determina la capacidad de los extractos para inhibir el proceso de esporulación de los ooquistes. El protocolo empleado fue similar al descrito por **Saratsis et al. (2012)**, modificando la técnica para adaptarla a las características de la especie de coccidio utilizada en el ensayo y a la disponibilidad de los extractos. En tubos Eppendorf se incubaron aproximadamente 5000 ooquistes con las concentraciones de extractos y dicromato potásico al 2 %. En cada tubo se dispensó 20 µl de solución con 5000 ooquistes, 30 µl de dH<sub>2</sub>O, 50 µl de dicromato potásico al 10 % y 100 µl de cada disolución de extracto o antiséptico evaluado. Se realizaron incubaciones de 30 min, 4 horas y 24 horas para los estudios de dosis-dependientes y de 24 horas para la evaluación de la actividad anticoccidiósica de los extractos

estudiados. Transcurrido el tiempo de incubación seleccionado, se realizaron tres lavados con dH<sub>2</sub>O mediante centrifugaciones a 420 x g durante 10 min a temperatura ambiente. Tras el último lavado se dispensaron 400 µl de solución de ooquistes en una placa de 24 pocillos, sobre los que se le añadieron 600 µl de una solución denominada “premezcla”, preparada con dicromato potásico al 10 % y dH<sub>2</sub>O. Como control positivo se utilizó formaldehído al 10 % (Panreac) y como control negativo DMSO. Los ooquistes dispensados en la placa se incubaron a temperatura ambiente hasta la lectura de los resultados. Los ooquistes se observaron a las 24 y 48 horas, realizándose la diferenciación entre ooquistes esporulados de los no esporulados cuando en los pocillos correspondientes al control negativo (DMSO) se observaba un 80 % de ooquistes esporulados (48 horas en el presente estudio).

<b>Extractos (mg/ml)</b>	<b>Control positivo Formaldehído 10% (%)</b>	<b>Control negativo DMSO (%)</b>
<b>12,5</b>	5	1,5
<b>6,25</b>	2,5	0,75
<b>3,125</b>	1,25	0,375
<b>0,625</b>	0,31	0,075
<b>0,0625</b>	0,03	0,0075

**Tabla 15.** Concentraciones finales utilizadas en los ensayos de EIS para los extractos metanólicos de planta entera de *R. pinnata*, *P. bituminosa* y *R. graveolens*, frutos maduros de *R. pinnata* y *R. graveolens* y la fracción acuosa del extracto metanólico de frutos maduros de *R. pinnata*. También se representan en la tabla las concentraciones del control positivo (formaldehído 10 %) y control negativo (DMSO).

<b>Productos (mg/ml)</b>	<b>Control positivo Formaldehído (10%)</b>	<b>Control negativo DMSO (%)</b>
<b>25</b>	5	3
<b>12,5</b>	2,5	1,5
<b>6,25</b>	1,25	0,75
<b>3,125</b>	0,31	0,1875
<b>0,625</b>	0,03	0,02534
<b>0,0625</b>	0,003	0,00253

**Tabla 16.** Concentraciones finales utilizadas en los ensayos de EIE para los productos elaborados a partir de cultivos *in vitro* de *R. pinnata* (CM-134, CM-135 y CM-140). También se representan en la tabla las concentraciones del control positivo (formaldehído 10 %) y control negativo (DMSO).

Extracto/Productos (mg/ml)	Control positivo Formaldehido (10%)	Control negativo DMSO (%)
3	5	3
1,5	2,5	1,5
0,75	1,25	0,75
0,1875	0,31	0,1875
0,02345	0,03	0,02534

**Tabla 17.** Concentraciones finales utilizadas en el estudio dosis-dependiente de la actividad anticoccidiósica en los ensayos de EIE para el extracto metanólico de frutos maduros de *R. pinnata* y el compuesto CM-475.3, elaborado a partir de un cultivo *in vitro* de *R. pinnata*. También se recogen en la tabla las concentraciones utilizadas del control positivo (formaldehido 10 %) y control negativo (DMSO).

#### 4.5.2. ENSAYOS DE VIABILIDAD DE ESPOROZOÍTOS (EVE)

Este ensayo permite comprobar si los extractos naturales tienen una actividad antiocccidiósica mediada por la alteración de la viabilidad de los esporozoítos de *Eimeria ninakohlyakimovae*, para lo cual se empleó una modificación del método utilizado por **Khalafalla et al. (2011)**. Para realizar este ensayo se dispensaron en placas de 96 pocillos 100µl de una solución de medio RPMI con 5000 esporozoítos, obtenidos por el método de purificación y desenquistamiento antes mencionado. Sobre la solución de ooquistes se añadieron las diferentes concentraciones de los extractos, además de los controles negativos, diluidos en todos los casos en medio RPMI. Como control positivo se empleó una solución de esporozoítos calentada a 60 °C durante 30 min, asegurando así la muerte de los mismos. Transcurridas 3 horas de incubación a temperatura ambiente se procedió a la lectura de los resultados. Para valorar la viabilidad de los esporozoítos se realizó una tinción con Sytox Orange (Invitrogen), un colorante de ácidos nucleicos capaz de atravesar la membrana nuclear dañada de los esporozoítos no viables. Para la realización de la tinción se retiraron 100 µl de solución de cada pocillo y se añadieron 100 µl de Sytox Orange. A continuación, la mezcla resultante se homogenizó e incubó durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, las muestras se observaron en un microscopio de fluorescencia (Eclipse 80i®, Olympus). Cada concentración se evaluó por triplicado y se realizaron dos ensayos similares en días diferentes.

Extracto (mg/ml)	Control negativo DMSO (%)
10	0,6
5	0,3
2,5	0,15
1,25	0,03
0,625	0,006
0,5	0,0075
0,025	0,0015

**Tabla 18.** Concentraciones finales utilizadas en el ensayo EVE para el extracto metanólico de frutos maduros de *R. pinnata*. También se muestran en la tabla las concentraciones utilizadas del control negativo (DMSO).

#### 4.5.3. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA INVASIÓN CELULAR (EICC)

Utilizando este ensayo se pretende estudiar si los extractos naturales disminuyen la capacidad de invasión celular de los esporozoítos. Con tal fin, un total de 50000 esporozoítos, obtenidos con el método comentado anteriormente, se incubaron en tubos Eppendorf con 1 ml de las diferentes concentraciones del extracto, los controles negativo (DMSO) y positivo (sulfadoxina/ trimetoprim, 200/40; Veterín-Diftrim<sup>®</sup>, Intervet) durante 3 horas a 37 °C y una atmósfera del 5 % de CO<sub>2</sub>. A continuación, se realizaron tres lavados con RPMI que contenía un 5 % de penicilina/estreptomicina centrifugando a 2000 × g 5 min. Una vez lavados, los esporozoítos tratados con las diferentes concentraciones del extracto se añadieron sobre BCEC confluentes cultivadas en placas de 12 pocillos y se incubaron a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Tras este periodo de incubación, se realizaron fotografías de 15 campos aleatorios por condición en un microscopio electrónico (Leica DFC 290) con una cámara adaptada. La tasa de invasión celular se obtuvo calculando la relación entre células totales y células infectadas por esporozoítos. Cada condición se realizó por triplicado y se realizaron un total de 3 ensayos idénticos en días distintos (**Burt et al., 2013**).

Extracto (mg/ml)	Control positivo Sulfadoxina/trimetoprim (µg/ml)	Control negativo DMSO (%)
5	10/2	0,3
2,5	0,1/0,02	1,5
0,5	0,001/0,0002	0,03
0,1	10 <sup>-6</sup> /2x10 <sup>-7</sup>	0,003
0,01	10 <sup>-9</sup> /2x10 <sup>-10</sup>	0,0003

**Tabla 19.** Concentraciones finales utilizadas en el ensayo EICC para el extracto metanólico de frutos maduros de *R. pinnata*. También se representan en la tabla las concentraciones del control positivo (Sulfadoxina/trimeroprim) y del control negativo (DMSO).

#### 4.5.4. ENSAYOS *IN VITRO* DE CITOTOXICIDAD

El estudio de citotoxicidad *in vitro* del extracto metanólico de *R. pinnata* se realizó en dos cultivos celulares diferentes. Se utilizaron cultivos *in vitro* de BCEC, que se hicieron crecer según la metodología explicada en el ensayo de inhibición de invasión celular, y células VERO (African Green monkey kidney cells). Estas últimas células fueron inicialmente obtenidas de la European Collection of Cell Cultures (ECAACC 84113001) y se cultivaron en medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado con L-glutamine 2 nM, 500 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomina y un 10 % de suero fetal bovino (Linus) (Ruiz *et al.*, 2010). Ambos tipos celulares se cultivaron en placas de 24 pocillos (Nunc) hasta que estuvieron confluentes y, en ese momento, se añadieron 150 µl de cada dilución del extracto o control negativo (DMSO), según se indica en la **Tabla 20**, más 250 µl de Sytox Orange. Como control negativo se utilizaron diluciones seriadas de DMSO. A continuación, se realizó una incubación durante toda la noche (aproximadamente 16 horas) y la lectura se llevó a cabo en un escáner de fluorescencia (Ascent Fluoroskan, Labsystems) (Agustine *et al.*, 1997).

Extracto (mg/ml)	Control negativo DMSO (%)
3,125	3
0,625	1,5
0,125	0,75
0,0125	0,325

**Tabla 20.** Concentraciones finales utilizadas en el ensayo *in vitro* de citotoxicidad para el extracto metanólico de frutos maduros de *R. pinnata*. También se muestran en la tabla las concentraciones utilizadas del control negativo (DMSO).

#### 4.6. ENSAYO *IN VIVO* CON NEMATODOS Y COCCIDIOS

El ensayo *in vivo* permitiría confirmar los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* sobre la actividad antihelmíntica y anticoccidiósica de los extractos analizados. Debido al coste económico que supone este tipo de análisis cuando se realizan en experimentos controlados, solamente se ensayaron dos extractos, uno de fruto maduro y otro de cultivos vegetales *in vitro*, en ambos casos de la planta *Ruta pinnata*. En el curso de inoculaciones experimentales de caprinos con *Haemonchus contortus* y *Eimeria ninakohlyakimovae*, se evaluó conjuntamente la actividad antihelmíntica y anticoccidiósica de ambos extractos.

##### 4.6.1. REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS

Antes de proceder a la inoculación de los animales, las cepas de *H. contortus* y *E. ninakohlyakimovae* se reactivaron mediante pase en animales donantes; con ello se pretendía asegurar que los parásitos eran totalmente viables.

Para la renovación de la cepa de *H. contortus* se inocularon 3 ovejas de raza Canaria con 7000 L3 del parásito. A partir del día 21 postinfección se empezaron a recoger heces para aislar, purificar y concentrar las larvas L3 por el método Baermann, ya comentado anteriormente. Los ooquistes de *E. ninakohlyakimovae* fueron aislados de 7 cabritos de raza Majorera, que se inocularon con 200.000 ooquistes esporulados. Estos cabritos se mantuvieron en condiciones estériles en el animalario del Hospital Dr. Negrín de Las Palmas de Gran Canaria. A los 14 días postinfección se recogieron las heces de los animales y la obtención de ooquistes llevó a cabo mediante la misma técnica explicada anteriormente para la realización de los ensayos *in vitro*.

#### 4.6.2. MATERIAL VEGETAL

Los extractos utilizados en el ensayo *in vivo* fueron el extracto CM-481 (extracto metanólico de frutos maduros de *Ruta pinnata* recolectados en el Campus de Ciencias Biológicas de la Universidad de La Laguna en Tenerife durante los meses de agosto y septiembre del 2011) y el CM-472 (muestras de extracto metanólico de material de cultivo *in vitro* de *Ruta pinnata* en medio MS6). Cada extracto se homogeneizó con una batidora y se diluyó en DMSO 6 % hasta su completa disolución, conservándose la mezcla en una cámara fría a 4 °C hasta su utilización. Se administraron 30 g de extracto metanólico de frutos maduros de *R. pinnata* y 27 g del extracto CM-472, lo que corresponde a aproximadamente 2 g/kg p.v., ya que los animales al comienzo del experimento pesaban en torno a 15 kg.

#### 4.6.3. VIABILIDAD Y EFECTO DE LAS LARVAS 3 UTILIZADOS EN EL ENSAYO *IN VIVO*

Previamente a la realización del ensayo *in vivo* se realizó un ensayo de parálisis larvaria (EPL) para comprobar que los extractos poseían actividad antihelmíntica y chequear la viabilidad de las L3 antes de la inoculación. El ensayo EPL se realizó siguiendo la misma metodología comentada anteriormente. Los dos extractos se probaron en diferentes concentraciones; se utilizó levamisol como control positivo y DMSO como control negativo (**Tabla 21**).

<b>Extracto/Producto (mg/ml)</b>	<b>Control negativo DMSO (%)</b>	<b>Control positivo Levamisol (µg/ml)</b>
<b>6,25</b>	3	0,125
<b>3,125</b>	1,5	0,0625
<b>1,5625</b>	0,75	0,03125
<b>0,3125</b>	0,1875	0,00625
<b>0,0625</b>	0,0375	0,00125
<b>0,00625</b>	0,00375	0,000125
<b>0,000625</b>	0,000375	0,0000125

**Tabla 21.** Concentraciones finales utilizadas en los ensayos EPL para comprobar la eficacia de los extractos *in vitro* antes de la realización del ensayo *in vivo* para el extracto metanólico de frutos maduros de *R. pinnata* (CM 481) y el compuesto CM-472 (producto elaborado a partir de un cultivo *in vitro* de *R. pinnata*). También se muestran en la tabla las concentraciones utilizadas del control positivo (levamisol) y del control negativo (DMSO).

#### **4.6.4. DISEÑO EXPERIMENTAL**

En el experimento se empleó un total de 18 caprinos de raza Majorera de entre 6-7 meses de edad pertenecientes a una granja situada en el Guriete, en el municipio de Santa Lucía de Tirajana, en la Isla de Gran Canaria. El experimento se realizó en dicha granja, para lo cual los animales se separaron del resto del rebaño y se dividieron en 5 grupos distintos: A, B, C, D y E:

**Grupo A:** animales inoculados y tratados con el extracto CM-481 (N=4)

**Grupo B:** animales inoculados y tratados con el extracto *in vitro* CM-472 (N=4)

**Grupo C:** animales inoculados y tratados con Ivermectina (SP Veterinaria) y Diclazuril (Vecoxan, Janssen-Cilag®) (N=4)

**Grupo D:** animales inoculados y no tratados (N=4)

**Grupo E:** animales no inoculados (N=2)

En la **Tabla 22** se recoge de forma gráfica todas las actuaciones llevadas a cabo a lo largo durante la experiencia en los diferentes grupos de animales: inoculación con *Haemonchus contortus* (IH), inoculación con *E. ninakohlyakimovae* (IE), tratamiento con los diferentes extractos o productos comerciales, según el grupo que corresponda (T), y toma de muestras de heces (F).

Días postinfección	0	14	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
Grupo A	IH	IE	F	F	F	FT	F	F	F	F	F	F	F
Grupo B	IH	IE	F	F	F	FT	F	F	F	F	F	F	F
Grupo C	IH	IE	F	F	F	FT	F	F	F	F	F	F	F
Grupo D	IH	IE	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Grupo E			F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F

Tabla 22. Esquema del protocolo experimentación.

#### 4.6.5. INOCULACIONES

##### 4.6.5.1 Inoculación de las larvas 3 de *H. contortus*

Las larvas 3 utilizadas para la inoculación de los animales fueron obtenidas por el método Baermann, posteriormente purificadas y conservadas a 4 °C. El día antes a la inoculación, las larvas se dejaron a temperatura ambiente para favorecer su reactivación. Los animales se inocularon con 7000 L3 vía intraruminal (**Fig. 3**), considerándose este día como el día 0 de la experiencia.

##### 4.6.5.2. Inoculación de los ooquistes de *E. ninakohlyakimovae*

Los animales se inocularon con 200.000 ooquistes vía oral con una sonda gástrica el día 14 del experimento (dos semanas después de la infección con *H. contortus*) con el fin de hacer coincidir los picos de eliminación en heces de huevos y ooquistes.



Figura 3. Inoculación intraruminal de L3 de *H. contortus* en caprinos

#### 4.6.6. TOMA DE MUESTRAS Y PROCESADO

Se tomaron muestras individuales de heces de todos los animales el día 14 del experimento, coincidiendo con el día de la inoculación con *E. ninakohlyakimovae*. Aunque, como se indicó, los animales fueron desparasitados 21 días antes del comienzo de la experiencia con ivermectina y diclazuril, la contaminación de los corrales motivó que todos los caprinos estuvieran infectados con ooquistes de diferentes especies. Con las heces recogidas se hicieron mezclas para cada grupo y se recogieron los ooquistes mediante flotación con solución saturada de sal. Con tal fin, los ooquistes adheridos al portaobjetos se retiraron con agua destilada y se recogieron en un vaso de precipitado. Se realizaron 3 flotaciones por lote para obtener la mayor cantidad de ooquistes posible. Después del último lavado se mezcló el volumen total recogido y se añadió dicromato potásico a una concentración final del 2 %. Las diferentes mezclas se dispensaron en botellas de cultivo celular con filtro y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante una semana. Tras este tiempo, la mayoría de los ooquistes recogidos había esporulado. A partir de ese momento se procedió a la diferenciación de las especies de *Eimeria* presentes en cada uno de los lotes de animales, para lo cual se siguieron los criterios descritos en la bibliografía (MAFF, 1986; Alyousif *et al.*, 1992; Soe *et al.*, 1992).

A partir del día 28 y hasta el día 38 del experimento se tomaron muestras de heces diariamente de todos los animales, incluidos los controles. Los recuentos, tanto de huevos como de ooquistes, se realizaron mediante el método de McMaster modificado (MAFF, 1989). Las heces que no se emplearon para la cuantificación de ooquistes y huevos se procesaron siguiendo la metodología explicada anteriormente para la diferenciación de especies de *Eimeria*. Las muestras se tomaron de forma individual directamente del recto de los animales, momento en el que se aprovechó

para observar y anotar la presencia o no de diarrea y las características de la misma, en su caso. También se anotaron otros síntomas, tales como: adelgazamiento, anorexia, mal pelaje, decaimiento, postración, anemia, etc.

#### 4.6.7. TRATAMIENTOS

El día 31 del experimento se procedió al tratamiento de los animales. A los animales pertenecientes a los grupos A y B se les administró vía oral con una sonda (**Fig. 4**) los extractos correspondientes. Los animales del grupo C se trataron con las dosis pertinentes de ivermectina (1 ml/ 50 Kg p.v.) y diclazuril (1 ml/ 10 Kg p.v.), vía intramuscular y oral, respectivamente. Al final de la experiencia (día 38 de la experiencia) todos los animales fueron desparasitados con estos mismos productos. Además, tras esta desparasitación, se realizaron chequeos coprológicos periódicos (días 15 y 30 después de terminado el estudio) para asegurar que todos los animales utilizados en la experiencia no presentaran parásitos en las heces.



**Figura 4.** Administración vía oral de los extractos

### 4.7 PROCESAMIENTO DE LOS DATOS Y ANALISIS ESTADISTICO

#### 4.7.1 ANÁLISIS DE LOS DATOS OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS *IN VITRO*

Para el análisis estadístico de los datos se agruparon todas las repeticiones para cada uno de los correspondientes ensayos y se estimaron las diferencias mediante el test no paramétrico Chi-cuadrado. El efecto de las diferentes concentraciones de extracto se comparó con los correspondientes controles DMSO y se consideraron significativas las diferencias para  $P < 0,05$ . En todos los análisis se utilizó el programa estadístico Sigmastat 3.1 bajo entorno Windows.

La dosis letal 50 (DL50) de cada extracto utilizado en los diferentes ensayos se obtuvo realizando un estudio de dispersión enfrentando los resultados obtenidos por cada extracto a las concentraciones utilizadas. Con la ecuación de la gráfica que más se ajustó a cada ensayo ( $R^2 > 0,8$ ) se hizo el cálculo de la DL50. El tipo de dispersión y el dato al que hace referencia la DL50 en cada ensayo se explica con detalle en la **Tabla 23**.

ENSAYO	TIPO DE DISPERSIÓN	SIGNIFICADO DOSIS LETAL 50 (DL50)
Ensayo de Eclosión de Huevos (EEH)	Lineal	Dosis de extracto necesaria para inhibir el desarrollo embrionario en el 50 % de los huevos
Ensayo de Desarrollo Larvario (EDL)	Logarítmica	Dosis de extracto necesaria para inhibir el desarrollo larvario del 50 % de las larvas
Ensayo de Parálisis Larvaria	Logarítmica	Dosis de extracto necesaria para inhibir la movilidad del 50 % de las larvas
Ensayo de Viabilidad de Adultos	Logarítmica	Dosis de extracto necesaria para causar la muerte del 50 % de los vermes
Ensayo de Inhibición de Esporulación de Ooquistes	Exponencial	Dosis de extracto necesaria para inhibir la esporulación del 50 % de los ooquistes
Ensayo de Viabilidad de Esporozoítos	Logarítmica	Dosis de extracto necesaria para causar la muerte del 50 % de los esporozoítos
Ensayo de Inhibición de la Invasión Celular	Logarítmica	Dosis de extracto necesaria para inhibir la invasión celular en un 50 %

**Tabla 23.** Tipo de dispersión que siguieron los resultados de cada ensayo en relación a las concentraciones y significado de la dosis letal 50 (DL50) en cada caso.

#### 4.7.2 ANÁLISIS DE LOS DATOS OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS *IN VIVO*

El análisis de los datos obtenidos en el ensayo *in vivo* se realizó de diferente forma según se tratara de recuentos de huevos de nematodos y recuentos de ooquistes por gramo de heces.

Para el análisis de los recuentos de huevos por gramos de heces se realizaron las medias de todos los grupos por separado. Las medias obtenidas en los grupos tratados con extractos se representaron gráficamente y se compararon diariamente con los respectivos controles positivos (grupo D, animales infectados y no tratados).

Debido a la gran variabilidad individual, no se observaron diferencias significativas utilizando análisis de varianza (ANOVA) y el test  $t$  de Student. Adicionalmente, los recuentos de HPG se agruparon y se analizaron estadísticamente antes y después del tratamiento para cada uno de los grupos experimentales de animales infectados y tratados. En primer lugar, las diferencias entre medias se estimaron mediante la prueba  $t$  de Student. Sin embargo, los datos no siguieron una distribución normal, hecho que se comprobó tras realizar el test de normalidad *Shapiro-Wilk*, por lo que finalmente los recuentos de huevos se analizaron mediante el *Mann-Whitney Rank Sum Test*. Se consideraron significativas las diferencias para  $P < 0,05$ . En el análisis se utilizó el programa estadístico Sigmastat bajo entorno Windows.

Los recuentos de ooquistes se transformaron en el “LOG OPG+1” con el objetivo de convertir los datos en una distribución normal de acuerdo al test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Las medias por grupo de estos datos se representaron gráficamente para cada grupo experimental junto a la diferenciación de especies de *Eimeria* y se analizaron igualmente utilizando análisis de varianza (ANOVA) y el test  $t$  de Student. De la misma forma que para los recuentos de huevos de *H. contortus*, los datos de OPG se agruparon antes y después del tratamiento y se analizaron de igual forma las posibles diferencias entre grupos.

# Resultados

---



## 5.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA MEDIANTE ENSAYOS *IN VITRO*

Tal y como se comentó en el capítulo de Material y Métodos, en el presente trabajo, se llevaron a cabo diferentes ensayos *in vitro* con el objetivo de determinar la actividad antihelmíntica frente a *Haemonchus contortus* (*H. contortus*) y anticoccidiósica frente a *Eimeria ninakohlyakimovae* (*E. ninakohlyakimovae*) de diferentes extractos vegetales. Para determinar la actividad antihelmíntica *in vitro* se utilizaron los siguientes ensayos: ensayo de eclosión de huevos, ensayo de desarrollo larvario, ensayo de parálisis larvaria y ensayo de viabilidad de adultos; mientras que para la evaluación de la actividad anticoccidiósica se realizaron, ensayos de esporulación de ooquistes, de viabilidad de esporozoítos y de inhibición de la invasión celular fueron los empleados para determinar la actividad anticoccidiósica.

### 5.1.1. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA

Se evaluó la actividad antihelmíntica *in vitro* frente al nematodo de pequeños rumiantes *H. contortus* de diferentes extractos naturales procedentes de tres plantas pertenecientes a la flora Canaria, *Ruta pinnata* (Rp), *Ruta graveolens* (Rg) y *Psoralea bituminosa* (Pb). El estudio incluyó el análisis de diferentes estados de maduración de sus frutos y de compuestos obtenidos a partir de cultivos *in vitro* de *R. pinnata* en distintos medios nutritivos. En todos los casos se emplearon distintos disolventes durante el proceso de extracción.

#### 5.1.1.1. Actividad antihelmíntica en parte aérea sin fructificar

Para la evaluación de la actividad antihelmíntica *in vitro* de *Ruta pinnata*, *Psoralea bituminosa* y *R. graveolens* se utilizaron extractos metanólicos de la parte aérea de cada una de las plantas. La actividad en sí se analizó mediante los ensayos de eclosión de huevos, desarrollo larvario, parálisis larvaria y viabilidad de adultos, determinándose de este modo el efecto ovicida, larvicida y adulticida de cada uno de ellas.

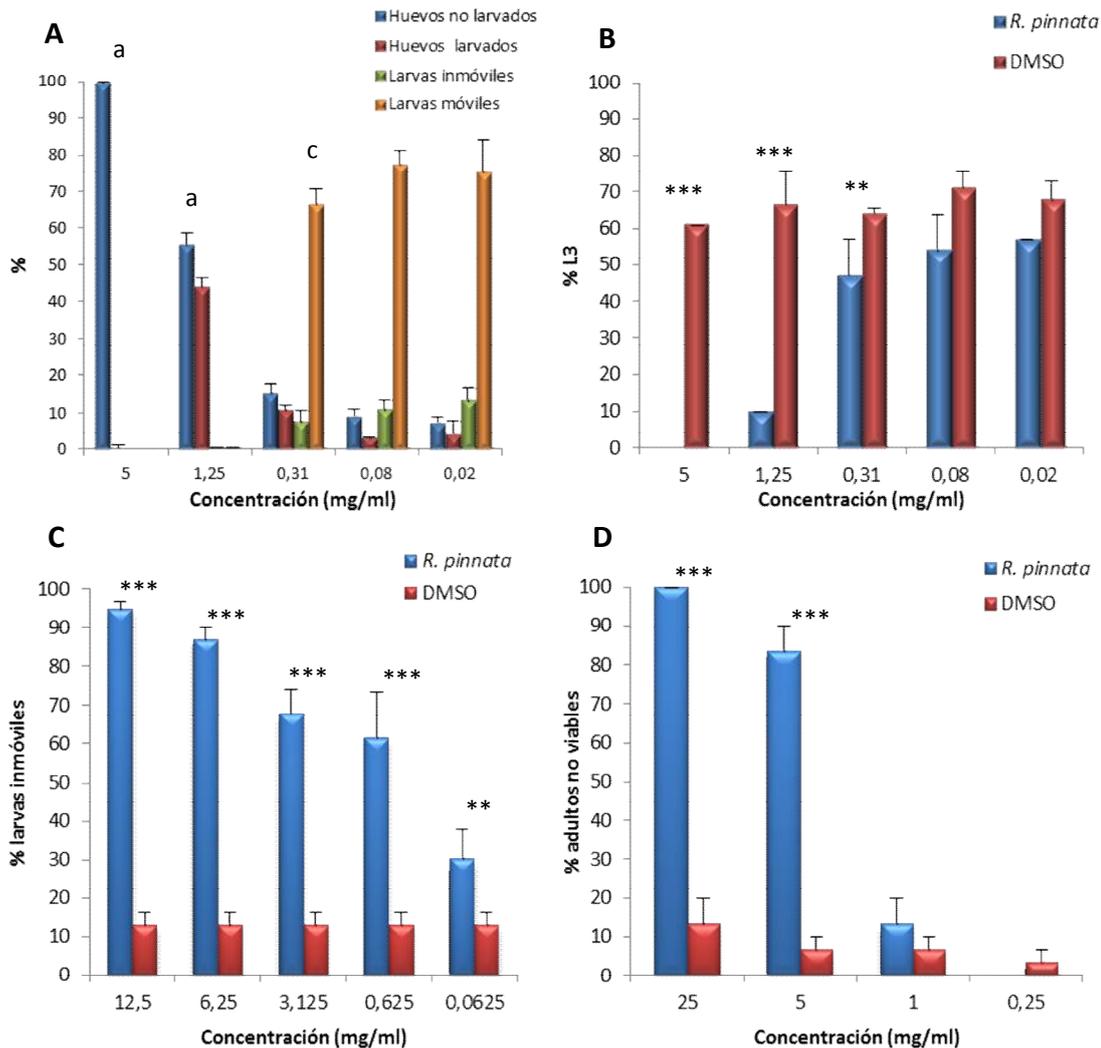
En la **Figura 5** se representan los resultados obtenidos después de realizar los diferentes ensayos con el extracto metanólico de planta entera de *Ruta pinnata*. El ensayo de eclosión de huevos (**Fig. 5A**) permite valorar, no solo el efecto ovicida del extracto, sino también la existencia de un efecto larvicida sobre las larvas 1 del parásito. El efecto ovicida, que se valoró en base al porcentaje de huevos que no habían embrionado después de 24 horas de incubación con el extracto, fue significativo a una concentración de 5 mg/ml. A esta concentración se observó que prácticamente el 100 % de los huevos no habían desarrollado una larva en su interior, disminuyendo este porcentaje hasta el 50 % en la siguiente concentración (1,25 mg/ml). El efecto ovicida fue dosis dependiente ya que, a partir de esta concentración, la actividad frente a los huevos de *H. contortus* siguió disminuyendo, no superando el 10 % el número de huevos no larvados. Aproximadamente, un 45 % de los huevos

embrionados no llegaron a eclosionar a una concentración de 0,31 mg/ml, por lo que se podría asumir una actividad larvicida de extracto sobre las L1 del parásito. Concentraciones inferiores a la antes señalada no tuvieron un efecto significativo sobre huevos ni larvas, ya que los porcentajes de larvas 1 viables (móviles) fueron similares a los encontrados en las correspondientes diluciones de DMSO utilizadas como control negativo (datos no mostrados).

El efecto larvicida del extracto fue evaluado mediante dos ensayos más, por un lado, valorando la capacidad de inhibir el desarrollo larvario (desde L1 hasta L3) una vez el huevo ha eclosionado (**Fig. 5B**) y, por otro lado, determinando la capacidad de producir parálisis en las L3 del parásito (**Fig. 5C**). El efecto sobre el desarrollo de las larvas en las mayores concentraciones de extracto utilizadas (5 y 1,25 mg/ml) fue estadísticamente significativo ( $P < 0,001$ ), quedando inhibido el desarrollo en un 100 % y en un 90 %, respectivamente, en relación a los controles. A concentración de 0,31 mg/ml la inhibición del desarrollo larvario se redujo hasta el 53 % y, en las siguientes concentraciones (0,08 y 0,02 mg/ml), la actividad fue similar a los resultados observados en los correspondientes controles negativos.

Los análisis sobre movilidad larvaria demostraron que los extractos eran activos a todas las concentraciones ensayadas (**Fig. 5C**). Así, el porcentaje de larvas inmóviles fue estadísticamente significativo desde 25 mg/ml ( $P < 0,001$ ) hasta 0,0625 mg/ml ( $P < 0,01$ ), con reducciones de la movilidad larvaria que oscilaron entre el 95 % y el 30 %, siguiendo una relación dosis dependiente. Se estimó que la inhibición de la movilidad fue de entorno al 50 % a concentración de 0,33 mg/ml, concentración a la cual se estableció la dosis suficiente para inhibir la movilidad larvaria de la mitad de las larvas (DL50).

La **Figura 5D** muestra que el efecto adulticida de *Ruta pinnata* fue significativo ( $P < 0,001$ ) a concentraciones de 12,5 y 5 mg/ml, con porcentajes de mortalidad de adultos del 100 % y 80 %, respectivamente. A las concentraciones menores ensayadas el efecto adulticida disminuyó, no observándose diferencias en relación al control negativo.



**Figura 5.** Estudio de la actividad antihelmíntica del extracto metanólico de planta entera de *Ruta pinnata*. Ensayo de eclosión de huevos (A), ensayo de desarrollo larvario (B), ensayo de parálisis larvaria (C) y ensayo de viabilidad de adultos (D). En todos los ensayos se usó DMSO a diferentes concentraciones como control negativo. Significación estadística:  $P < 0,001$  (\*\*\*) y  $P < 0,01$  (\*\*); y  $P < 0,05$  (\*) para la actividad larvicida y adulticida;  $P < 0,001$  (a),  $P < 0,01$  (b) y  $P < 0,05$  (c) para la actividad ovicida obtenida en el ensayo de eclosión de huevos.

Los resultados de la evaluación de la actividad antihelmíntica de los extractos metanólicos de planta entera de *P. bituminosa* y *R. graveolens* se encuentran representados en las **Figura 6** y **Figura 7**, respectivamente.

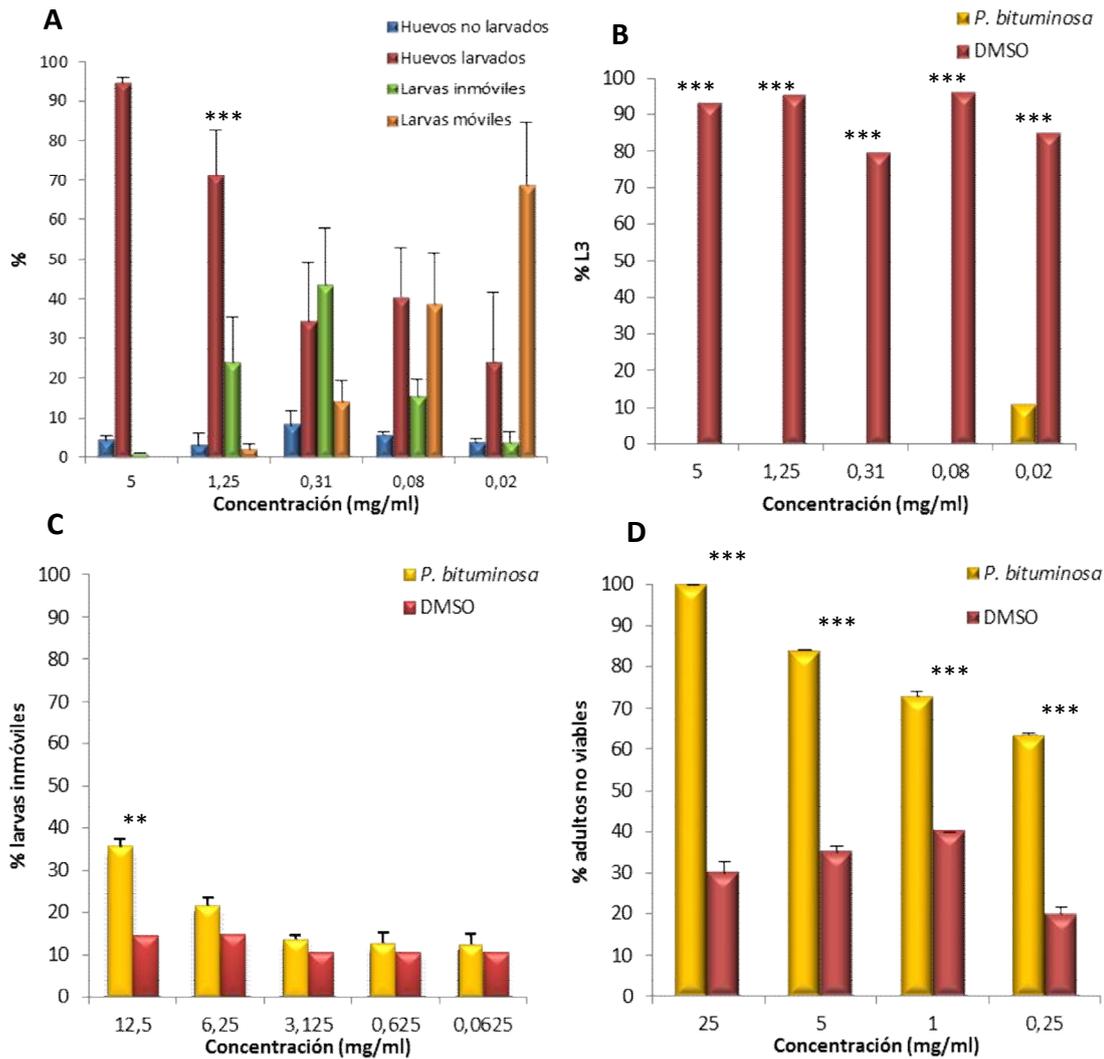
En general, el efecto antihelmíntico de *P. bituminosa* no fue muy marcado ya que únicamente mostró actividad significativa inhibiendo el desarrollo larvario (**Fig. 6B**) y sobre los adultos de *H. contortus* (**Fig. 6D**). Así, en la **Figura 6A** se observa cómo el porcentaje de huevos no embrionados nunca llegó a ser superior al 10 % en ninguna de las concentraciones utilizadas en el ensayo. Por el contrario, el porcentaje de huevos embrionados que no habían eclosionado sí estuvo significativamente incrementado, siendo cercano al 95 % a 5 mg/ml y próximo al 70 % a una concentración de 1,25 mg/ml. A partir de esta concentración, el número de huevos

larvados fue disminuyendo, al tiempo que comenzaron a aparecer una mayor cantidad de larvas libres, móviles e inmóviles. Además, los extractos también provocaron un incremento, no significativo en este caso, del porcentaje de larvas inmóviles a concentraciones de entre 1,25 y 0,08 mg/ml. A concentraciones menores (0,02 mg/ml) el porcentaje de larvas móviles fue similar al encontrado en los controles negativos

El ensayo de desarrollo larvario mostró que el extracto metanólico de planta entera de *P. bituminosa* tuvo efecto notable frente las larvas de *H. contortus* inhibiendo su transformación de L1 a L3 de forma significativa incluso a 0,02 mg/ml (**Fig. 6B**). Fue a esta concentración donde únicamente se observó la presencia de L3; en el resto de concentraciones utilizadas en el ensayo no se encontró ninguna L3. Estos resultados contrastan con la actividad de los extractos frente a las larvas de tercer estado cuando se realizaron los tests de movilidad larvaria (**Fig. 6C**). En este caso, el extracto solo mostró actividad significativa ( $P < 0,01$ ) frente a las L3 del parásito a concentraciones de 12,5 mg/ml; a partir de esta concentración el porcentaje de larvas inmóviles descendió igualándose al control negativo. Por último, los extractos de *P. bituminosa* causaron la muerte de los vermes adultos de *H. contortus* con porcentajes de mortalidad que oscilaron entre el 100 % (25 mg/ml) y el 65 %, a una concentración final de 0,25 mg/ml (**Fig. 6D**). Estos porcentajes de mortalidad fueron similares a los obtenidos por el levamisol, control positivo del ensayo, que presentó una actividad adulticida del 100 % en todas las concentraciones ensayadas (resultados no mostrados).

El extracto metanólico de *Ruta graveolens* mostró diferente efecto dependiendo de estadio del parásito que se evaluó (**Fig. 7**). La actividad ovicida varió desde un 100 % hasta menos del 10 % según la concentración utilizada. En concreto, a 5 mg/ml se inhibió completamente la eclosión de los huevos, siendo esta actividad significativa ( $P < 0,001$ ) y similar al control positivo utilizado en el ensayo (oxybendazol). A concentración de 0,31 mg/ml el porcentaje de huevos no embrionados disminuyó hasta aproximadamente el 20 %, observándose a dicha concentración un porcentaje moderadamente elevado de huevos larvados que aún no habían eclosionado, por lo que el extracto fue capaz de detener el desarrollo larvario dentro del huevo. El número de larvas móviles aumentó de forma considerable en las concentraciones menores de extracto hasta alcanzar el 80 % registrado en los controles (**Fig. 7A**).

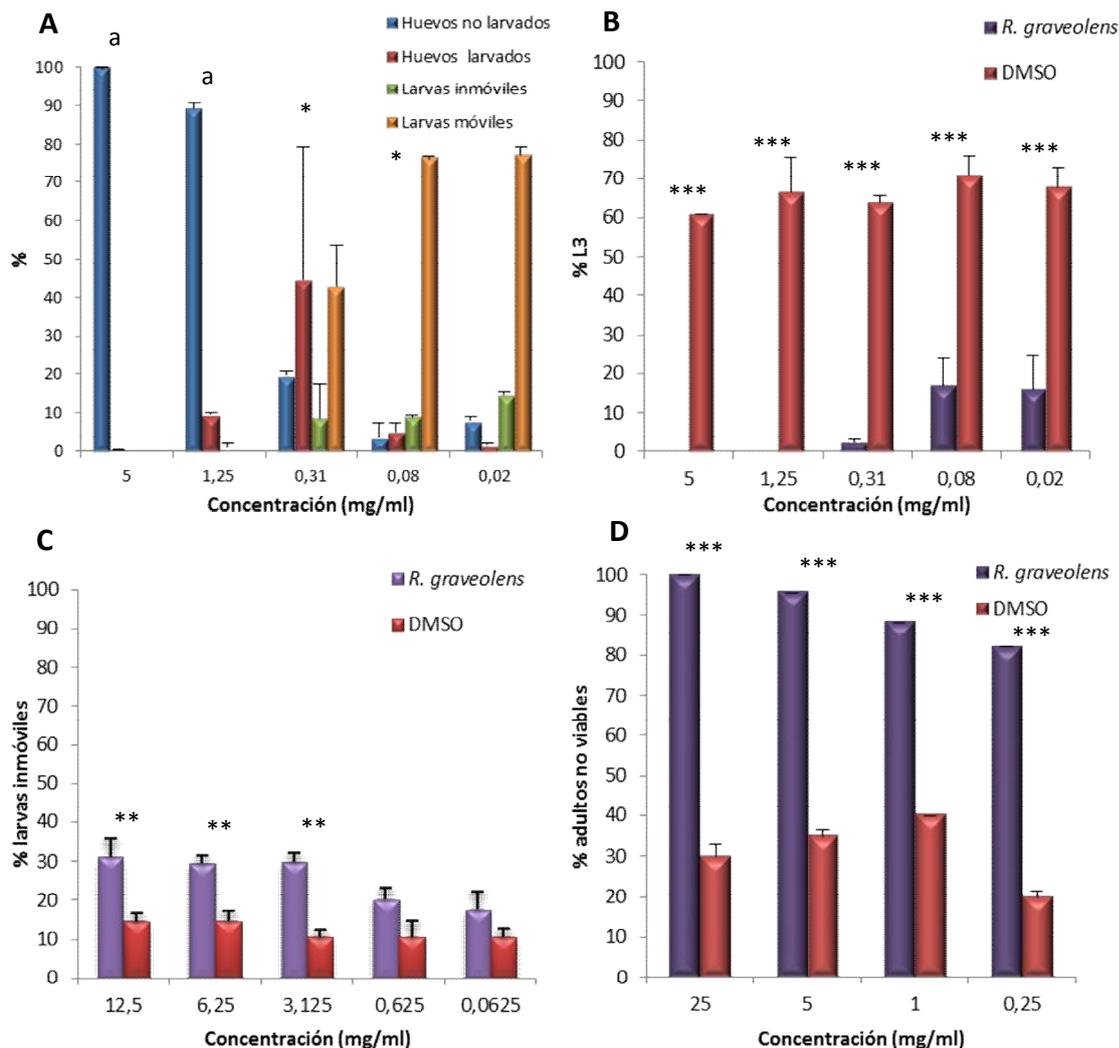
El efecto del extracto de *R. graveolens* frente a las larvas de *H. contortus* evaluado mediante el ensayo de desarrollo larvario demostró una importante actividad larvicida, ya que el extracto inhibió en más de un 80 % el desarrollo de las larvas en toda las concentraciones utilizadas, siendo de un 100 % en las concentraciones mayores (**Fig. 7B**). Sin embargo, esta actividad no fue tan notoria cuando se valoró el efecto frente a las L3 de *H. contortus*, pues no se observaron porcentajes de larvas inmóviles superiores al 40 %, ni siquiera a las concentraciones mayores utilizadas en el ensayo de parálisis larvaria (12,5, 6,25 y 3,125 mg/ml). Aun así, se observaron diferencias significativas con respecto al control negativo ( $P < 0,01$ ). A partir de 3,125 mg/ml, el porcentaje de larvas inmóviles continuó disminuyendo hasta valores cercanos al 20 %, siendo estos resultados similares a los del correspondiente control negativo (DMSO) (**Fig. 7C**).



**Figura 6.** Estudio de la actividad antihelmíntica del extracto metanólico de planta entera de *P. bituminosa*. Ensayo de eclosión de huevos (A), ensayo de desarrollo larvario (B), ensayo de parálisis larvaria (C) y ensayo de viabilidad de adultos (D). En todos los ensayos se usó DMSO a diferentes concentraciones como control negativo. Significación estadística:  $P < 0,001$  (\*\*\*) y  $P < 0,01$  (\*\*); y  $P < 0,05$  (\*) para la actividad larvicida y adulticida;  $P < 0,001$  (a),  $P < 0,01$  (b) y  $P < 0,05$  (c) para la actividad ovicida obtenida en el ensayo de eclosión de huevos.

Al analizar el efecto adulticida se observó que el extracto de *R. graveolens* produjo la muerte de los vermes de forma significativa ( $P < 0,01$ ) a todas las concentraciones ensayadas. A 25 mg/ml la mortalidad de los adultos fue de un 100 %, este porcentaje fue disminuyendo ligeramente en las siguientes concentraciones hasta el 85 % (0,25 mg/ml) (Fig. 7D).

## RESULTADOS



**Figura 7.** Estudio de la actividad antihelmíntica del extracto metanólico de planta entera de *R. graveolens*. Ensayo de eclosión de huevos (A), ensayo de desarrollo larvario (B), ensayo de parálisis larvaria (C) y ensayo de viabilidad de adultos (D). En todos los ensayos se usó DMSO a diferentes concentraciones como control negativo. Significación estadística:  $P < 0,001$  (\*\*\*) y  $P < 0,01$  (\*\*); y  $P < 0,05$  (\*) para la actividad larvicida y adulticida;  $P < 0,001$  (a),  $P < 0,01$  (b) y  $P < 0,05$  (c) para la actividad ovicida obtenida en el ensayo de eclosión de huevos.

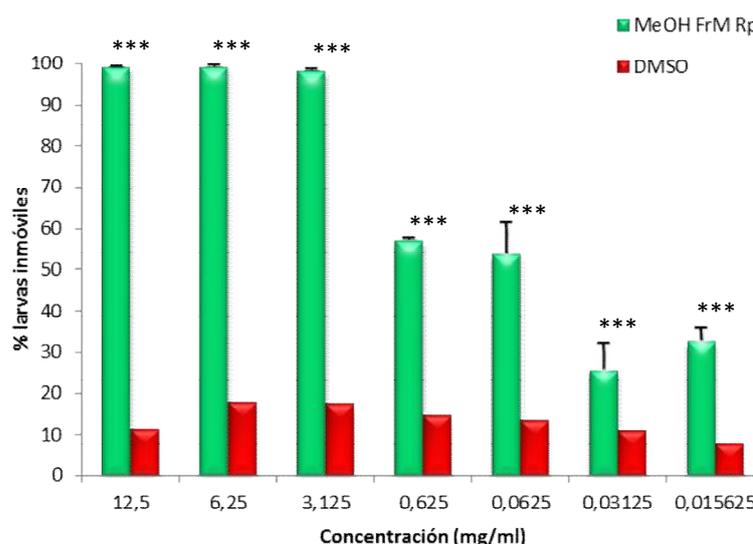
### 5.1.1.2. Actividad antihelmíntica de frutos

Los resultados comentados en el apartado anterior muestran que, al valorar en conjunto los efectos ovicida, larvicida y adulticida, *Ruta pinnata* tuvo mayor actividad antihelmíntica que las otras dos ensayadas. Por este motivo, se decidió profundizar más en el estudio de la actividad antihelmíntica de esta planta, considerándose importante evaluar el efecto larvicida de sus frutos en distintos estados de maduración, dado que en otras especies con actividad antihelmíntica, es precisamente en los frutos donde se concentra una mayor cantidad de productos activos. Para ello se realizó el test de parálisis larvaria utilizando extractos elaborados a partir de frutos maduros y verdes. Como se redactó de forma más amplia en el apartado de materiales

y métodos, en primer lugar se realizó una extracción con metanol (MeOH) y, a continuación, se llevó a cabo una segunda extracción con diferentes disolventes.

#### 5.1.1.2.1. Estudio comparativo mediante EPL en frutos de *R. pinnata* con diferente grado de maduración utilizando distintos disolventes

En la **Figura 8** se muestran los resultados del ensayo de parálisis larvaria después de 24 horas de incubación del extracto metanólico crudo de frutos maduros (MeOH FrM Rp). Se observó que el efecto sobre las L3 de *H. contortus* del extracto era elevado, disminuyendo la movilidad de las larvas en un 100 % desde concentraciones de 12,5 mg/ml hasta 3,125 mg/ml. A continuación, la actividad disminuyó, manteniéndose en torno al 50 % entre concentraciones de 0,625 y 0,0625 mg/ml. Aunque el porcentaje de larvas inmóviles fue menor al 40 % en las menores concentraciones utilizadas en el ensayo, se siguieron mostrando diferencias significativas con el control negativo incluso a 0,015 mg/ml, donde la actividad observada fue 32,84 %. En base a estos resultados, la dosis eficaz inhibitoria 50 se estableció en 0,1 mg/ml. Esta actividad fue similar a la presentada por el control positivo (resultados no mostrados) en las distintas concentraciones utilizadas.



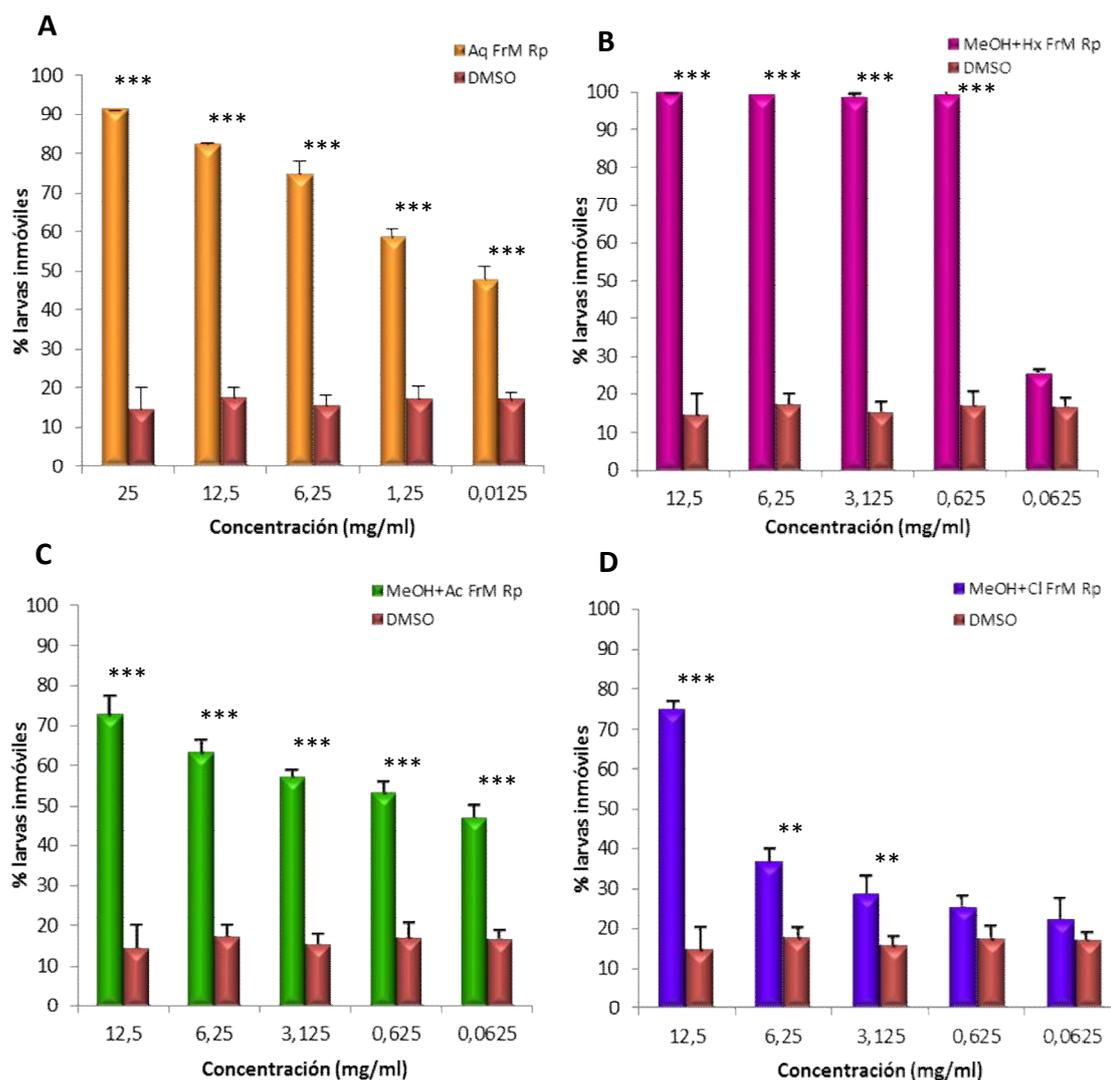
**Figura 8.** Ensayo de parálisis larvaria. Actividad antihelmíntica del extracto metanólico elaborado con frutos maduros de *Ruta pinnata* (MeOH FrM Rp). Como control negativo se usó DMSO y como control positivo levamisol a diferentes concentraciones. Significación estadística  $P < 0,001$  (\*\*\*)

La actividad antihelmíntica de las fracciones obtenidas a partir del extracto metanólico crudo y del extracto acuoso de los frutos maduros fue muy variable (**Fig. 9**). El extracto acuoso (Aq FrM Rp) (**Fig. 9A**) presentó una alta actividad larvicida a 25 mg/ml, concentración a la que el 90 % de larvas 3 eran inmóviles. A partir de esta concentración la actividad del extracto fue decreciendo en forma dosis dependiente hasta una concentración de 0,0125 mg/ml, donde el porcentaje de larvas inmóviles fue del 47,28 %. En todos los casos se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,001$ ). La

fracción hexánica (MeOH+Hx FrM Rp) también mostró un efecto antihelmíntico estadísticamente significativo ( $P < 0,001$ ) hasta una concentración de 0,625 mg/ml, siendo el porcentaje de larvas inmóviles del 100 %. Únicamente, no hubo diferencias con respecto al control negativo en la menor concentración utilizada en el ensayo (0,0625 mg/ml) (**Fig. 9B**). Cuando se utilizó la fracción de acetato de etilo (MeOH+Ac FrM Rp) el mayor porcentaje de larvas inmóviles que se observó fue del 72,66 % a una concentración de 25 mg/ml; a partir de esta concentración la actividad disminuyó de una forma dosis dependiente hasta alcanzar el 47 % a concentración de 0,0625 mg/ml. En todas las concentraciones se mostraron diferencias con el control negativo ( $P < 0,001$ ) (**Fig. 9C**). Al contrario que las fracciones hexánicas y de acetato de etilo, la fracción elaborada con cloroformo (MeOH+Cl FrM Rp) no mostró un efecto larvicida elevado. En la **Figura 9D** se observa que dicho extracto sólo mostró una importante actividad a 25 mg/ml, concentración a la que el porcentaje de larvas inmóviles fue superior al 70 % ( $P < 0,001$ ). En el resto de concentraciones utilizadas este porcentaje no superó el 40 %, aunque se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,01$ ) con respecto al control negativo a concentraciones de 6,25 mg/ml y 3,125 mg/ml.

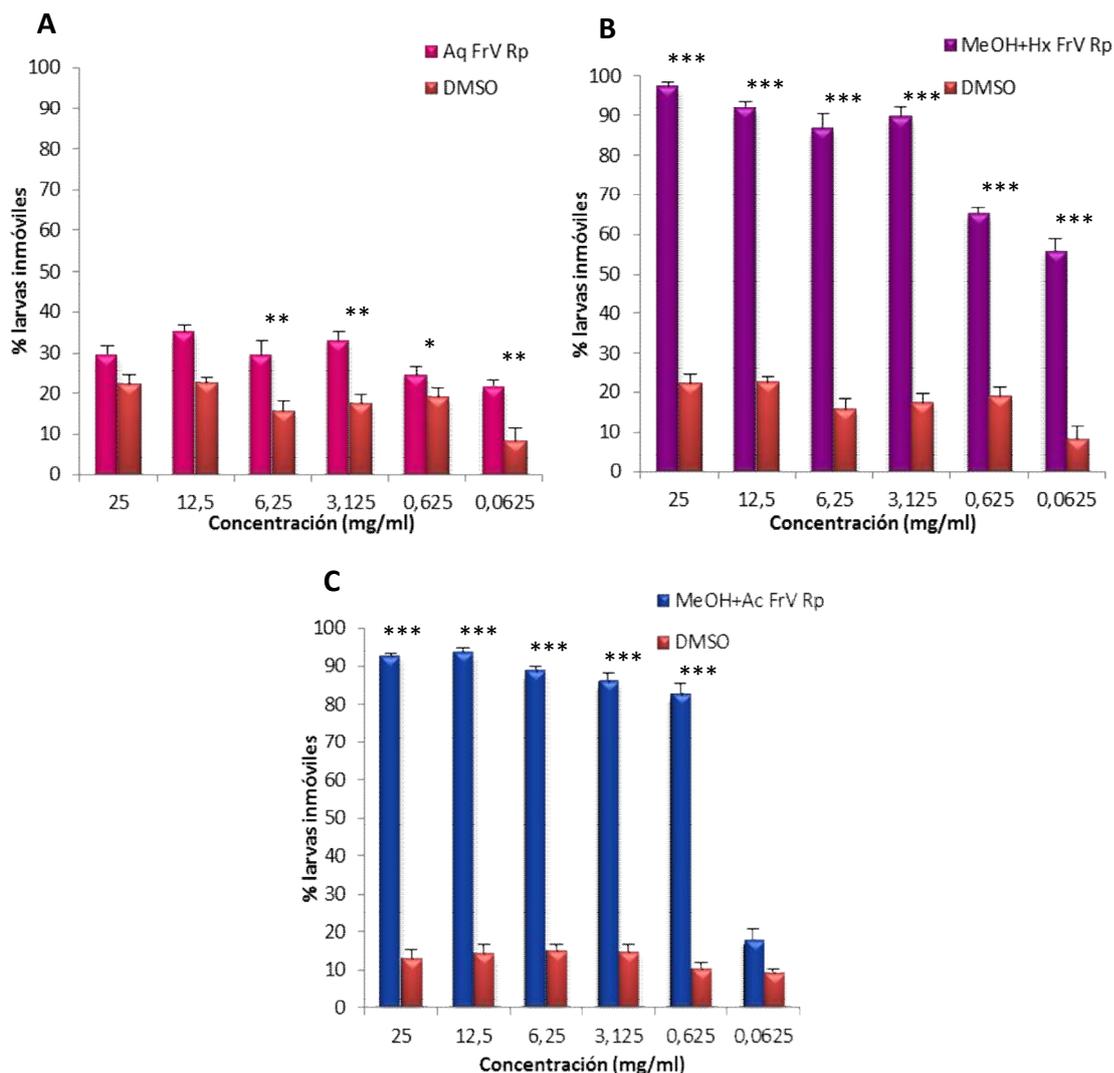
La actividad larvicida de los extractos elaborados a partir de frutos verdes de *Ruta pinnata* fue muy variada y se observaron grandes diferencias entre ellos (**Fig. 10**). En el extracto acuoso (Aq FrV Rp) el porcentaje de larvas inmóviles fue menor al 40 % en todas las concentraciones ensayadas, aunque se observaron diferencias significativas ( $P < 0,01$  y  $P < 0,05$ ) con el control negativo en algunas de ellas. La DL50 calculada para este extracto fue 0,04 mg/ml, siendo cuatro veces mayor al obtenido con el mismo tipo de extracto elaborado con frutos maduros.

Por otro lado, las fracciones hexánica y de acetato de etilo, obtenidas del extracto metanólico de frutos verdes de *Ruta pinnata*, mostraron una actividad antihelmíntica similar a las mismas fracciones de frutos maduros. El extracto hexánico (MeOH+Hx FrV Rp) mostró una actividad cercana al 100 % a 25 mg/ml, a continuación disminuyó ligeramente manteniéndose el porcentaje de larvas inmóviles superior al 90 % hasta la concentración de 3,125 mg/ml. En las siguientes concentraciones (0,625 mg/ml y 0,0625 mg/ml) el efecto volvió a disminuir, pero las diferencias siguieron siendo significativas con respecto al control negativo ( $P < 0,001$ ) (**Fig. 10B**).



**Figura 9.** Ensayo de parálisis larvaria. Comparación de la actividad antihelmíntica del extracto acuoso (Aq FrM Rp) (A) y fracciones del extracto metanólico; fracción hexánica (MeOH+Hx FrM Rp) (B), fracción de acetato de etilo (MeOH+Ac FrM Rp) (C) y cloroformo (MeOH+Cl FrM Rp) (D) elaborado con frutos maduros de *Ruta pinnata*. Como control negativo se usó DMSO y como control positivo levamisol a diferentes concentraciones. Significación estadística  $P < 0,001$  (\*\*\*) y  $P < 0,01$  (\*\*).

Al igual que el extracto anterior, la fracción de acetato de etilo de los frutos verdes (MeOH+Ac FrV Rp) mostró una actividad larvívica elevada. El porcentaje de larvas inmóviles fue superior al 85 % incluso a concentraciones de 0,625 mg/ml ( $P < 0,001$ ). Solamente a concentración de 0,0625 mg/ml de extracto no se encontraron diferencias significativas con respecto al correspondiente control negativo (Fig. 10C).



**Figura 10.** Ensayo de parálisis larvaria. Comparación de la actividad antihelmíntica del extracto acuoso (Aq FrV Rp) (A) y fracciones del extracto metanólico; fracción hexánica (MeOH+Hx FrV Rp) (B) y fracción de acetato de etilo (MeOH+Ac FrV Rp) (C) elaborado con frutos verdes de *Ruta pinnata*. Como control negativo se usó DMSO y como control positivo levamisol a diferentes concentraciones. Significación estadística  $P < 0,001$  (\*\*\*),  $P < 0,01$  (\*\*) y  $P < 0,05$  (\*).

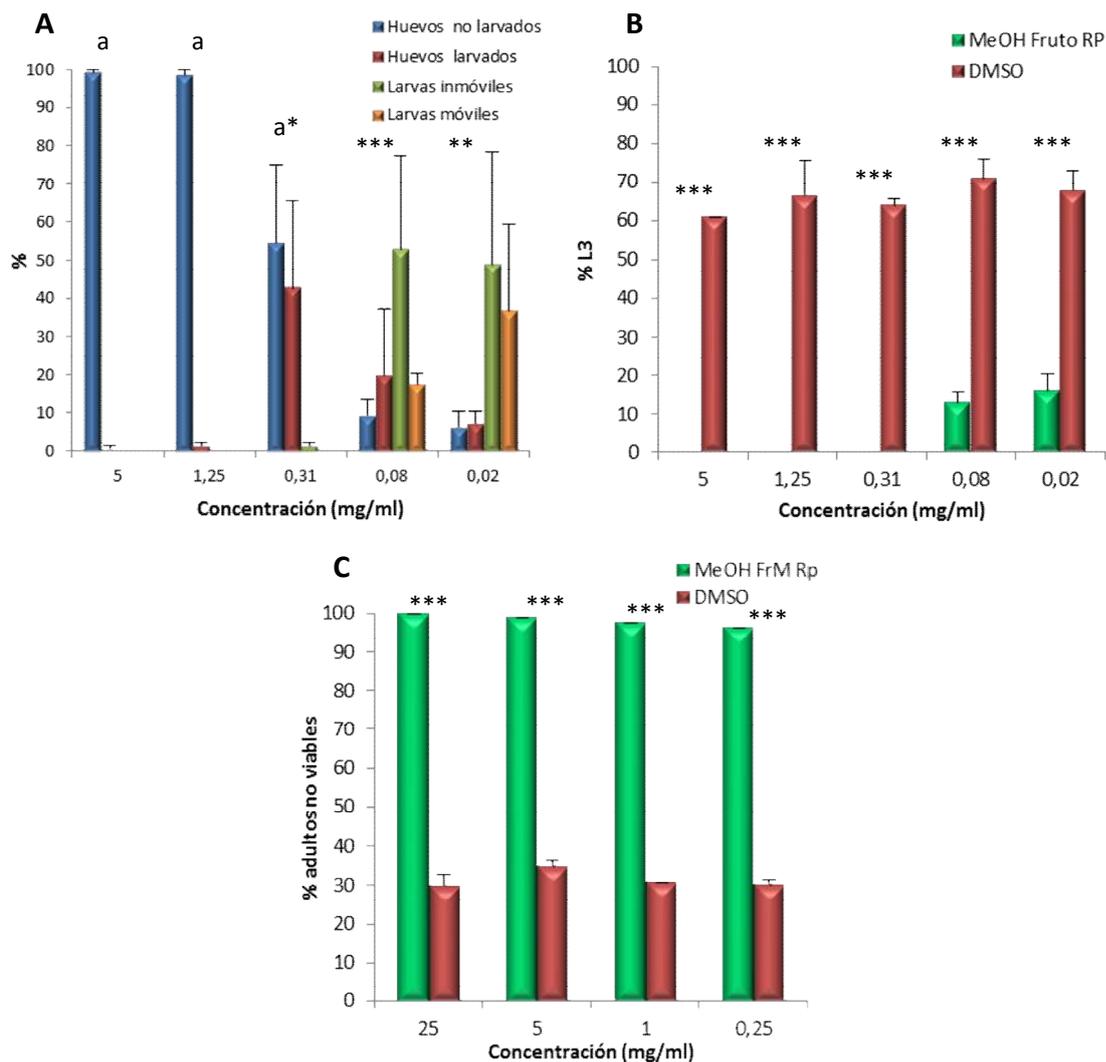
#### 5.1.1.2.2. Actividad ovicida, larvicida y adulticida de frutos maduros de *R. pinnata* mediante EEH, EDL y EVA.

Como se comentó en el apartado anterior, el extracto metanólico elaborado a partir de frutos maduros de *Ruta pinnata* presentó una actividad larvicida significativa, incluso a concentraciones de 0,01 mg/ml. Por este motivo se realizó una evaluación de la actividad más amplia, realizándose ensayos de eclosión de huevos, ensayos de desarrollo larvario y ensayos de movilidad de adultos con dicho extracto. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 11**.

En el ensayo de eclosión de huevos, el extracto presentó una actividad ovicida del 100 % a concentraciones de 5 y 1,25 mg/ml, inhibiendo por completo el desarrollo de los huevos. Utilizando la siguiente concentración (0,31 mg/ml), la actividad

disminuyó al 55 %, siendo en este caso prácticamente igual el número de huevos no larvados que el de huevos larvados; además, a esta concentración, todas las larvas que lograron eclosionar se encontraban inmóviles. El porcentaje de huevos no embrionados continuó disminuyendo en las siguientes concentraciones, hasta ser menor del 10 % a las dos últimas concentraciones ensayadas. Paralelamente, el número de larvas L1 aumentó considerablemente, tanto las inmóviles como las móviles, siendo la mayoría inmóviles a 0,08 mg/ml, mientras que a concentración de 0,02 mg/ml la mayor parte de las larvas eran móviles (**Fig. 11A**). A estas concentraciones, el patrón observado en los correspondientes controles negativos de DMSO demostraba un predominio de L1 móviles (datos no mostrados), por lo que se encontraron diferencias significativas en ambos casos ( $P < 0,001$  y  $P < 0,01$ , respectivamente), además, el efecto ovicida fue igual (100 %) al control positivo (datos no mostrados) utilizado en el ensayo en las mayores concentraciones de extracto (5 y 1,25 mg/ml).

## RESULTADOS



**Figura 11.** Estudio de la actividad antihelmíntica del extracto metanólico de frutos maduros de *R. pinnata* (MeOH FrM Rp). Ensayo de eclosión de huevos (**A**), ensayo de desarrollo larvario (**B**) y ensayo de viabilidad de adultos (**C**). En todos los ensayos se usó DMSO a diferentes concentraciones como control negativo. Significación estadística:  $P < 0,001$  (\*\*\*) ,  $P < 0,01$  (\*\*) y  $P < 0,05$  (\*) para la actividad larvicida y adulticida;  $P < 0,001$  (a),  $P < 0,01$  (b) y  $P < 0,05$  (c) para la actividad ovicida obtenida en el ensayo de eclosión de huevos.

La actividad larvicida del extracto metanólico de los frutos maduros de *Ruta pinnata* no sólo fue destacable inhibiendo la movilidad de las L3 (tal y como se describió en el apartado anterior), sino que, además, inhibió en altos porcentajes el desarrollo larvario. En la **Figura 11B** se observa que el extracto ensayado bloqueó totalmente el desarrollo larvario, incluso a concentraciones de 0,31 mg/ml. El efecto larvicida continuó siendo destacado y significativo ( $P < 0,001$ ) a 0,02 mg/ml, concentración a la que el porcentaje de L3 fue menor del 20 %. La actividad antihelmíntica del extracto no sólo fue elevada frente a huevos y larvas sino que también lo fue frente a los adultos. Así, en todas las concentraciones utilizadas en el ensayo de viabilidad de adultos se obtuvo un actividad cercana al 100 %, incluso a concentraciones de 0,25 mg/ml, siendo las diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles negativos de DMSO ( $P < 0,001$ ) (**Fig. 11C**).

### 5.1.1.3. Actividad antihelmíntica de cultivos *in vitro* de *Ruta pinnata*

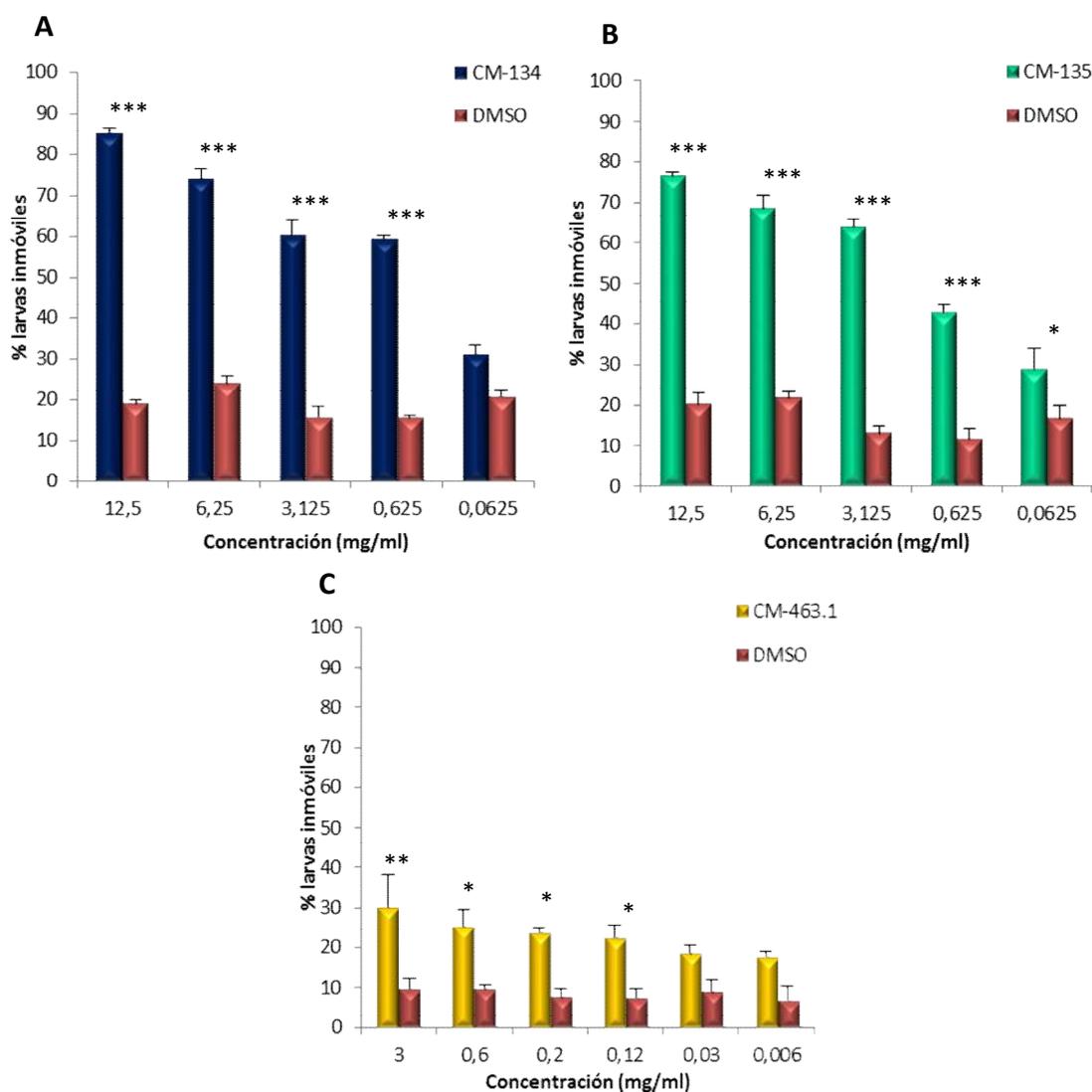
En el presente trabajo no sólo se evaluó la actividad antihelmíntica de extractos naturales elaborados a partir de las plantas ya mencionadas sino que, además, se utilizaron compuestos obtenidos a partir de cultivos *in vitro* de material vegetal de *Ruta pinnata*, cuya producción en condiciones de laboratorio podría ser de interés dado que se trata de una especie protegida. Como se comentó en el apartado de material y métodos, en primer lugar se realizó una extracción con metanol de los diferentes cultivos y, a partir de éstos, una segunda extracción con diferentes disolventes: hexano, acetato de etilo, cloroformo y agua. Todos ellos se analizaron mediante ensayos de parálisis larvaria (EPL).

#### 5.1.1.3.1. Estudio comparativo mediante EPL de extractos metanólicos obtenidos de cultivos *in vitro* de material vegetal de *Ruta pinnata* en diferentes medios

En la **Figura 12** se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de parálisis larvaria realizados con tres compuestos metanólicos cultivados *in vitro* en diferentes tipos de medio Murashige-Skoog (MS): el compuesto CM-134 fue cultivado en medio MSe, el compuesto CM-135 en medio MS6 más MS3 y, por último, el compuesto CM-463.1 se cultivó en medio MS6.

El compuesto CM-134 (**Fig. 12A**) mostró una actividad larvicida dosis dependiente: A una concentración de 12,5 mg/ml y después de 24 horas de incubación con el extracto, el porcentaje de larvas inmóviles fue del 85 %. A partir de esta concentración la actividad disminuyó progresivamente hasta el 30 %, siendo la DL50 igual a 0,26 mg/ml. La actividad del compuesto CM-134 mostró diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) con respecto al control negativo en todas las concentraciones ensayadas, a excepción de 0,0625 mg/ml, concentración en la ya no existieron diferencias respecto a la dilución correspondiente de DMSO. El compuesto CM-135 mostró una actividad similar al CM-134. Aunque con una DL50 mayor (0,81 mg/ml), su actividad siguió también un patrón dosis dependiente que comenzó en el 80 % (12,5 mg/ml) y decreció gradualmente hasta el 30 % a una concentración de 0,0625 mg/ml, mostrando diferencias significativas con el control negativo en todas las concentraciones analizadas (**Fig. 12B**). Sin embargo, el compuesto CM-463.1 no mostró una actividad tan marcada a las mismas concentraciones, ya que su efecto larvicida no superó el 30 % en ninguna de ellas, manteniéndose los resultados en valores no mucho más elevados que los de los correspondientes controles negativos; aun así, existieron diferencias ( $P < 0,05$ ) entre ambos a concentraciones mayores de 0,12 mg/ml (**Fig. 12C**).

## RESULTADOS



**Figura 12.** Ensayo de parálisis larvaria. Comparación de la actividad antihelmíntica de extractos metanólicos obtenidos a partir de cultivos *in vitro* de material vegetal de *R. pinnata* en diferentes medios; compuesto CM-134 (medio MSe) (A), compuesto CM-135 (medios MS6 y MS3) (B) y compuesto CM-463.1 (medio MS6). Como control negativo se usó DMSO y como control positivo levamisol a diferentes concentraciones. Significación estadística  $P < 0,001$  (\*\*\*),  $P < 0,01$  (\*\*) y  $P < 0,05$  (\*).

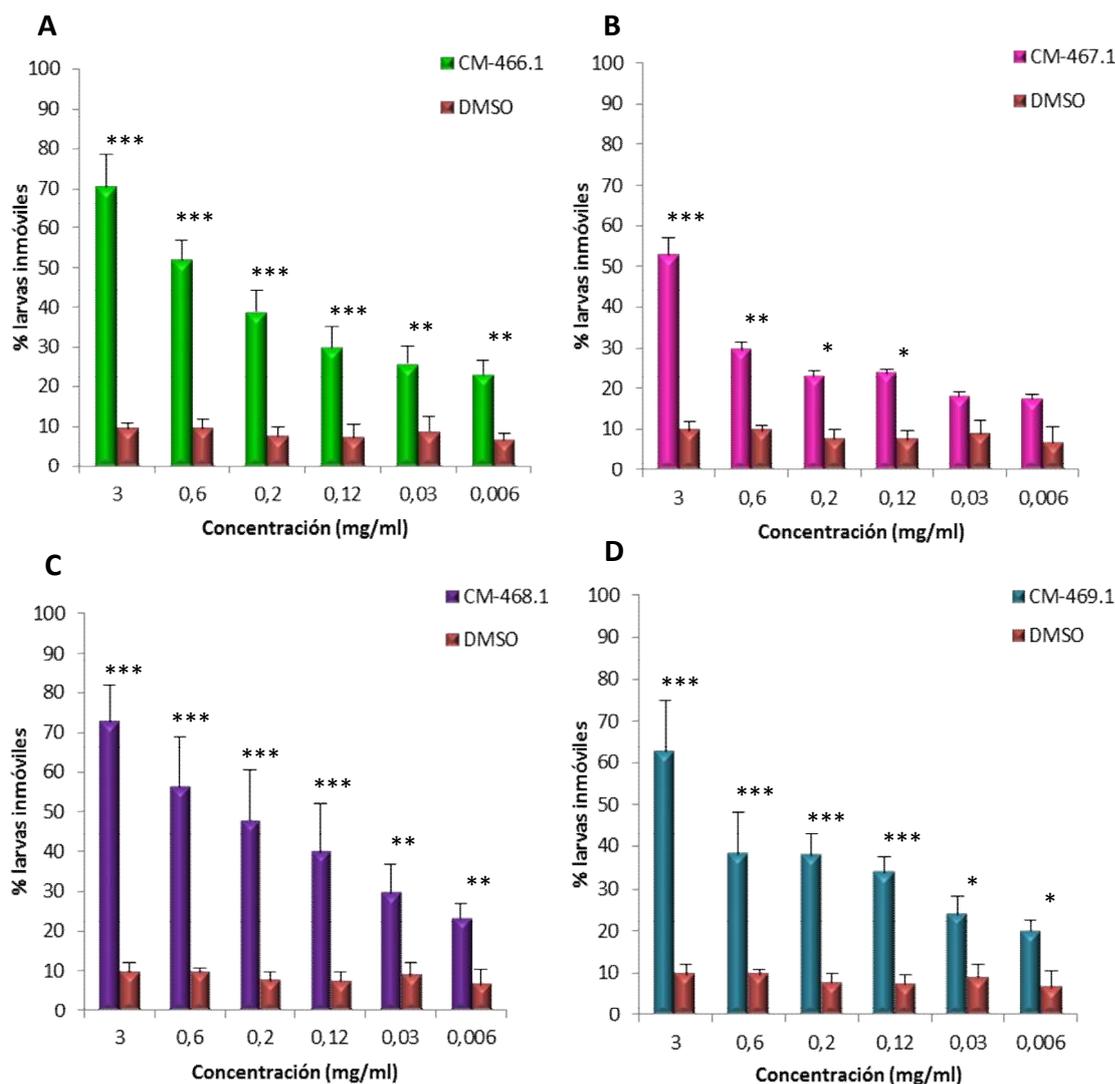
### 5.1.1.3.2. Estudio comparativo mediante EPL de extractos elaborados a partir de cultivos *in vitro* de *R. pinnata* utilizando distintos disolventes

Además de estudiar la actividad larvicida de extractos metanólicos elaborados a partir de diferentes cultivos *in vitro* de *Ruta pinnata*, se realizaron ensayos de parálisis larvaria con distintas fracciones del compuesto CM-463.1, preparado inicialmente mediante extracción metanólica. Mediante la segunda extracción se obtuvieron las siguientes fracciones: fracción hexánica (CM-466.1), fracción de cloroformo (CM-467.1), fracción de acetato de etilo (CM-468.1) y fracción acuosa (CM-469.1).

Los cuatro extractos mostraron actividad larvicida similar siendo significativa en tres de ellos, a diferencia de lo descrito anteriormente para compuesto CM-463.1 a

partir del cual se obtuvieron dichos extractos (**Fig. 13**). La fracción hexánica, compuesto CM-466.1, comenzó disminuyendo la movilidad larvaria en un 70 % a una concentración de 3 mg/ml; la segunda concentración redujo la movilidad hasta un 50 % aproximadamente, estableciéndose la dosis letal 50 en 0,49 mg/ml. Concentraciones menores a ésta mostraron porcentajes de parálisis larvaria menores del 40 %, aunque siguió siendo una actividad significativa incluso a 0,006 mg/ml ( $P < 0,01$ ) (**Fig. 13A**). El extracto CM-467.1 no mostró una actividad tan destacada como la fracción hexánica, aun así redujo la movilidad larvaria en más del 50 % a 3 mg/ml y del 29,22 % en la siguiente concentración (0,6 mg/ml). A partir de esta concentración, el porcentaje de larvas inmóviles continuó disminuyendo, no siendo significativas las diferencias con respecto al control negativo en las dos últimas concentraciones ensayadas (**Fig. 13B**). Las fracciones de acetato de etilo (CM-468.1) y acuosa (CM-469.1) mostraron actividades similares a la fracción hexánica. El porcentaje de larvas inmóviles obtenido por el compuesto CM-468.1 fue de 72,8 % a una concentración de 3 mg/ml. El efecto larvicida comenzó a disminuir progresivamente, de manera dosis dependiente, a partir de esta concentración, siendo del 23,46 % en la última concentración utilizada en el ensayo (0,006 mg/ml). La actividad de la fracción de acetato de etilo fue estadísticamente significativa con respecto al control negativo incluso a la menor concentración analizada, con una significación que osciló entre  $P < 0,001$  y  $P < 0,001$  (**Fig. 13C**). Con la fracción acuosa del extracto metanólico CM-463.1 se obtuvieron resultados similares al extracto anterior. En este caso, utilizando 3 mg/ml de extracto, el porcentaje de larvas paralizadas fue del 62,67 % y del 38,18 % a 0,6 mg/ml; a partir de esta concentración, el porcentaje de larvas inmóviles se mantuvo en torno al 20-30 %, siendo significativas las diferencias, incluso, a la menor concentración ensayada ( $P < 0,05$ ) (**Fig. 13D**).

## RESULTADOS



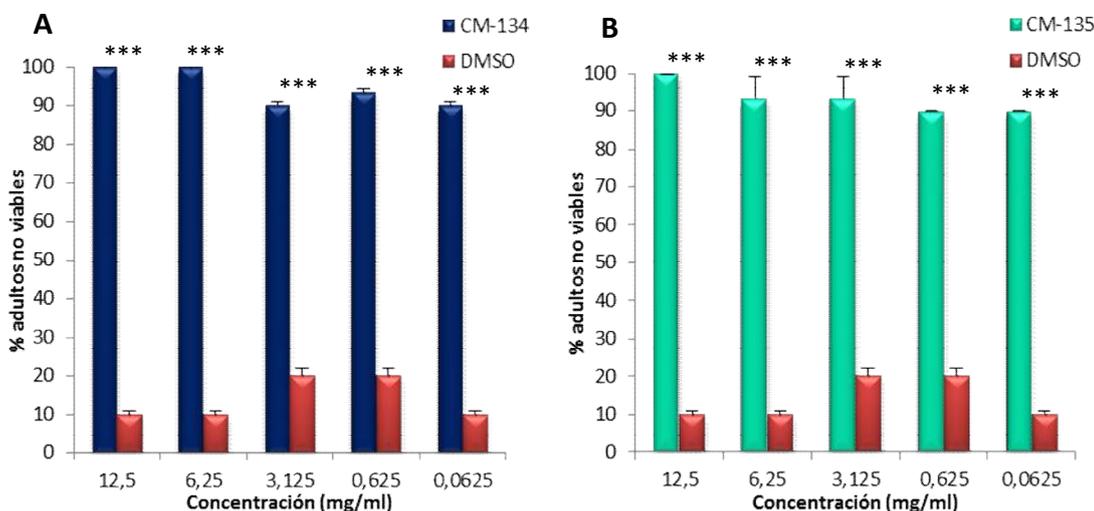
**Figura 13.** Ensayo de parálisis larvária. Comparación de la actividad antihelmíntica de cuatro fracciones del extracto metanólico CM-463.1, inicialmente obtenido a partir de cultivos *in vitro* de material vegetal de *R. pinnata*; compuesto CM-466.1 (fracción hexánica) (A), compuesto CM-467.1 (fracción con cloroformo) (B), compuesto CM-468.1 (fracción de acetato de etilo) (C) y compuesto CM-469.1 (fracción acuosa) (D). Como control negativo se usó DMSO y como control positivo levamisol a diferentes concentraciones. Significación estadística  $P < 0,001$  (\*\*\*),  $P < 0,01$  (\*\*) y  $P < 0,05$  (\*).

### 5.1.1.3.3. Estudio comparativo mediante EVA de extractos metanólicos obtenidos de cultivos *in vitro* de material vegetal de *Ruta pinnata* en diferentes medios

Los compuestos CM-134 y CM-135 mostraron una alta actividad antihelmíntica produciendo parálisis larvária en altos porcentajes, incluso a concentraciones de 0,625 mg/ml. En base a estos resultados se procedió a la evaluación del efecto de ambos extractos frente a vermes adultos de *H. contortus* con el objeto de completar el estudio de su actividad antihelmíntica.

Ambos compuestos mostraron una actividad adulticida estadísticamente significativa ( $P < 0,001$ ), siendo el porcentaje de adultos no viables superior al 90 % en todas las concentraciones utilizadas en el ensayo. Estos porcentajes de mortalidad

fueron elevados incluso a concentraciones tan bajas como 0,0625 mg/ml, situándose la dosis necesaria para causar la muerte al 50 % de los vermes por debajo de esta concentración (**Fig. 14**). La actividad adulticida de los compuestos *in vitro* CM-134 y CM-135 fue igual a la presentada por el levamisol, control positivo del ensayo, en las diferentes concentraciones utilizadas (resultados no mostrados).



**Figura 14.** Ensayo viabilidad de adultos. Comparación de la actividad antihelmíntica de extractos metanólicos obtenidos a partir de cultivos *in vitro* de material vegetal de *R. pinnata* en diferentes medios; compuesto CM-134 (medio MSe) **(A)** y compuesto CM-135 (medios MS6 y MS3) **(B)**. Como control negativo se usó DMSO y como control positivo levamisol a diferentes concentraciones. Significación estadística  $P < 0,001$  (\*\*\*)

### 5.1.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTICOCCIDIÓSICA

Al igual que para la determinación de la actividad antihelmíntica, para evaluar la actividad antioocidiósica se utilizaron una gran variedad de extractos vegetales de *Ruta pinnata*, tanto naturales como procedentes de cultivos *in vitro* de la planta. Del mismo modo, se realizaron estudios comparativos con las plantas *Ruta graveolens* y *Psoralea bituminosa*. Los ensayos *in vitro* utilizados para ello fueron: ensayo de inhibición de esporulación, ensayo de viabilidad de esporozoítos y ensayo de inhibición de la invasión celular.

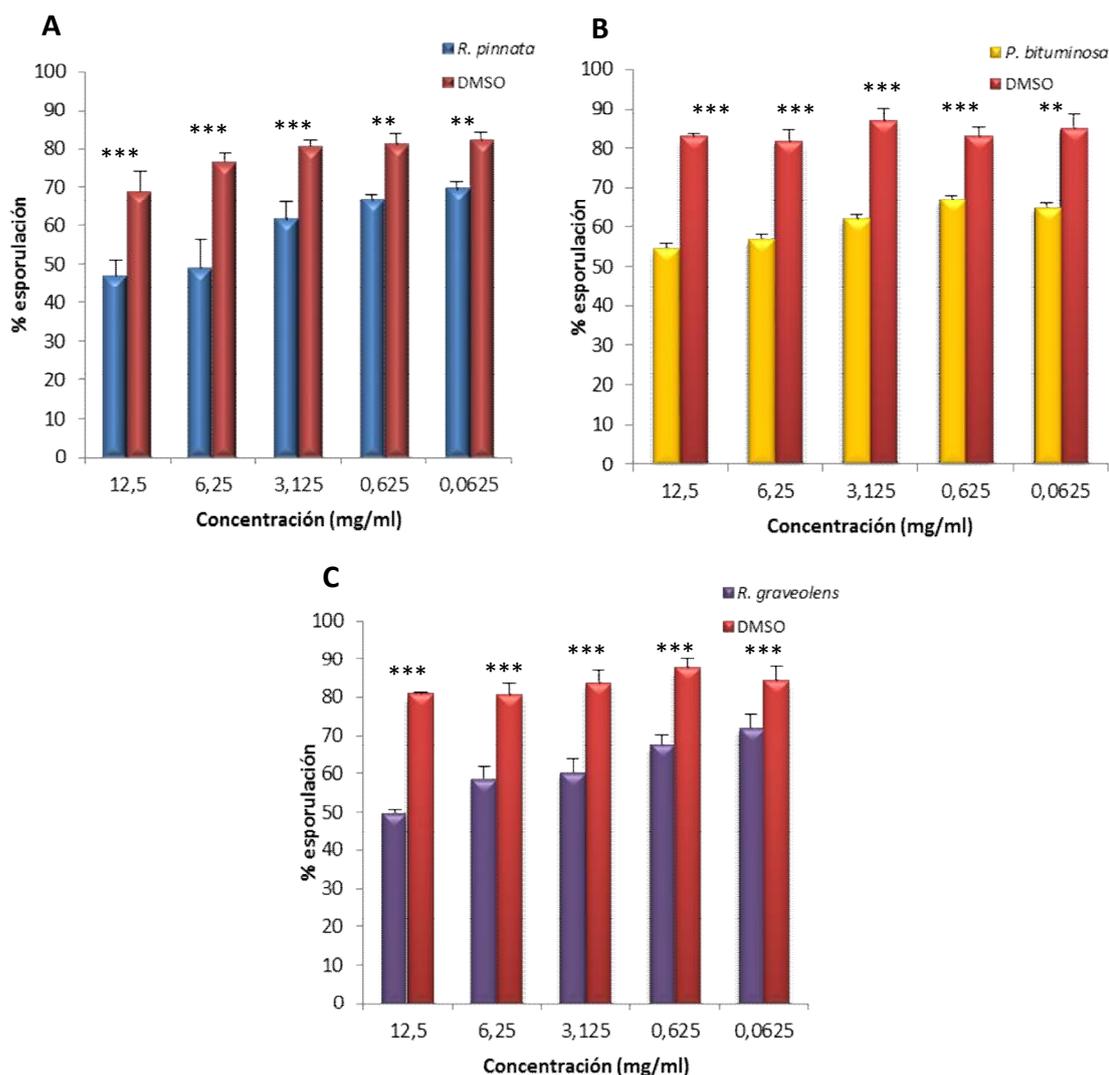
#### 5.1.2.1. Ensayo de inhibición de la esporulación

Con este ensayo se pretendió evaluar la capacidad de los extractos naturales y productos *in vitro* de inhibir la esporulación de los ooquistes de *Eimeria ninakohlyakimovae* y, de esta manera, comprobar si los extractos tenían capacidad de interferir en el ciclo exógeno de parásito.

#### 5.1.2.1.1. Evaluación de la actividad anticoccidiósica de diferentes extractos metanólicos

Al igual que para los ensayos con nematodos, se utilizaron extractos metanólicos (MeOH) elaborados a partir de las partes aéreas de las tres plantas pertenecientes a la flora canaria y, además, se analizaron frutos en distintos estados de maduración de las dos rutáceas. La actividad anticoccidiósica se determinó tras 24 horas de incubación con los correspondientes extractos y posterior lavado con agua destilada.

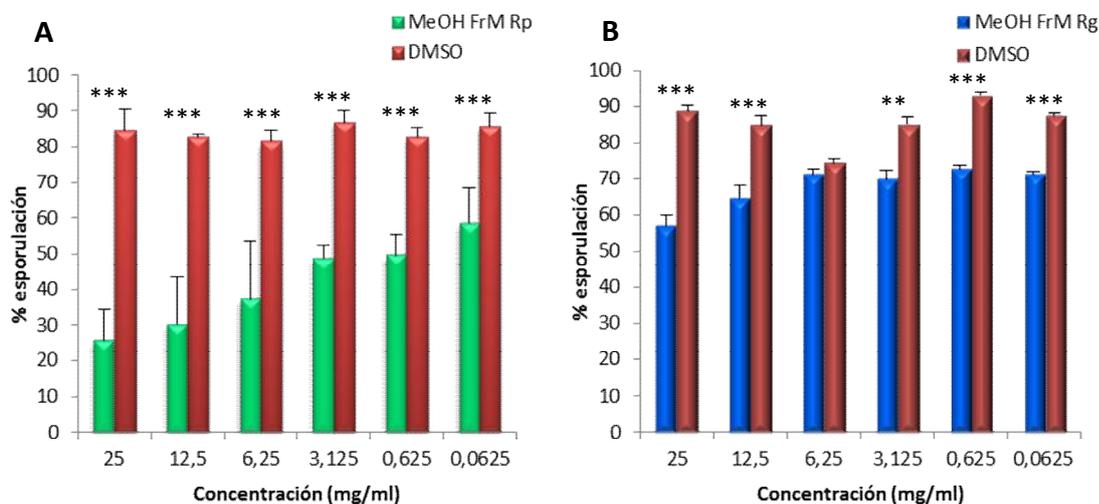
Los extractos metanólicos de *Ruta pinnata* (Rp), *Psoralea bituminosa* (Pb) y *Ruta graveolens* (Rg) mostraron actividades similares frente a los ooquistes de *E. ninakohlyakimovae* (**Fig. 15**). En la **Figura 15A** se muestran los porcentajes de esporulación obtenidos en el ensayo con el extracto metanólico de *R. pinnata*. A una concentración de 12,5 mg/ml, el número de ooquistes esporulados fue menor del 50 %, aumentando este valor a medida que disminuían las concentraciones, hasta alcanzar el 69,52 % con la menor concentración de extracto utilizada (0,0625 mg/ml). Incluso a esta última concentración, el porcentaje de esporulación fue significativamente menor que en los correspondientes controles negativos (DMSO) ( $P < 0,01$ ). Estos resultados fueron prácticamente iguales a los obtenidos tanto con el ensayo realizado con *Psoralea bituminosa* como con *Ruta graveolens*. *P. bituminosa* mostró valores de esporulación cercanos al 55 % a concentraciones de 12,5 y 6,25 mg/ml; a continuación, este porcentaje aumentó ligeramente, manteniéndose en torno al 65 % en las siguientes concentraciones. En todos los casos se observaron diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) respecto a los controles negativos (**Fig. 15B**). También el caso del extracto metanólico de *R. graveolens*, el efecto sobre la esporulación de los ooquistes siguió una dosis dependiente. Los valores de esporulación fueron cercanos al 50 % a las mayores concentraciones y aumentaron progresivamente hasta el 70 %. En todas las concentraciones ensayadas se encontraron diferencias significativas con respecto al DMSO (**Fig. 15C**). La dosis a la cual el 50 % de los ooquistes no había esporulado (DL50) fue dos veces menor con los extractos de *R. pinnata* que con los procedentes de *P. bituminosa* y *R. graveolens* (6,24 mg/ml, 12,075 mg/ml y 12,78 mg/ml, respectivamente).



**Figura 15.** Ensayo de inhibición de la esporulación de ooquistes. Se evaluó el efecto anticoccidiósico de los extractos metanólicos elaborados a partir de *R. pinnata* (A), *P. bituminosa* (B) y *R. graveolens* (C) a diferentes concentraciones. Como control positivo se usó formaldehído al 10% y como control negativo DMSO a diferentes concentraciones. Significación estadística  $P < 0,001$  (\*\*\*) y  $P < 0,01$  (\*\*).

El efecto de los extractos metanólicos de frutos maduros de *R. graveolens* (MeOH FrM Rg) y de *R. pinnata* (MeOH FrM Rp) sobre la esporulación de ooquistes de *E. ninakohlyakimovae* se representa en la **Figura 16**. Los extractos de *R. graveolens* produjeron una disminución moderada de la esporulación en comparación con el control negativo, oscilando el porcentaje de ooquistes esporulados entre el 50 y el 70 %, aproximadamente, en todas de las concentraciones estudiadas. Aun así, existieron diferencias significativas respecto al control negativo, incluso a la menor concentración de extracto utilizada en el ensayo (0,00625 mg/ml) (**Fig. 16B**). El extracto metanólico elaborado con frutos maduros de *R. pinnata* mostró una alta actividad anticoccidiósica mayor a la descrita para *Ruta graveolens* (**Fig. 16A**). El porcentaje de ooquistes esporulados no llegó a sobrepasar el 50 % hasta una concentración de 0,625 mg/ml, encontrándose diferencias significativas con respecto al control negativo hasta la concentración de 0,0625 mg/ml ( $P < 0,001$ ). A esta concentración, el porcentaje de

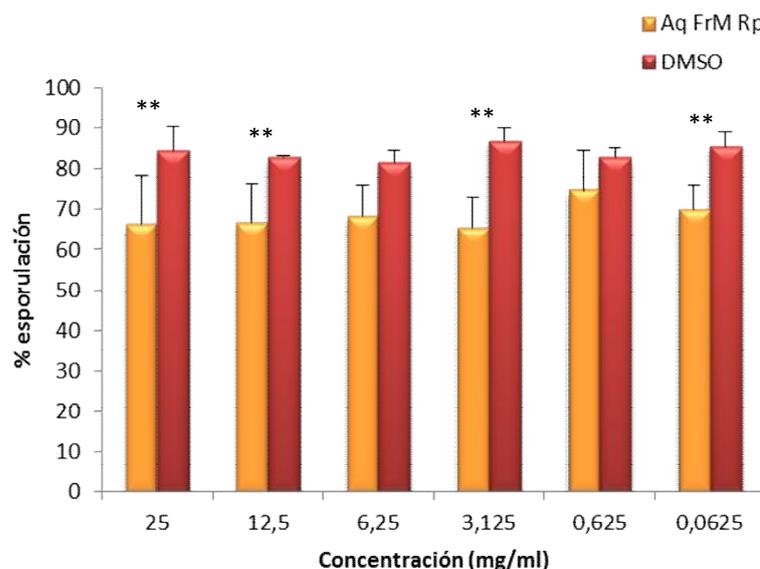
ooquistes esporulados no llegó al 60 %, mientras que en todas las concentraciones de DMSO utilizadas fue superior al 80 %.



**Figura 16.** Ensayo de inhibición de la esporulación de ooquistes. Se evaluó el efecto anticoccidiósico de los extractos metanólicos de frutos maduros de *R. pinnata* (MeOH FrM Rp) **(A)** y *R. graveolens* (MeOH FrM Rg) **(B)**. Como control positivo se usó formaldehído al 10% y como control negativo DMSO a diferentes concentraciones. Significación estadística  $P < 0,001$  (\*\*\*) y  $P < 0,01$  (\*\*).

#### 5.1.2.1.2. Actividad anticoccidiósica de extractos acuosos de frutos maduros de *Ruta pinnata*

El extracto acuoso (Aq FrM Rp) sólo mostró una capacidad moderada para inhibir la esporulación **(Fig. 17)**. Prácticamente a todas las concentraciones ensayadas, el porcentaje de ooquistes esporulados osciló entre el 65 y 70 %. No obstante, existieron diferencias significativas ( $P < 0,01$ ) a determinadas concentraciones de extracto al comparar con las correspondientes diluciones de DMSO.



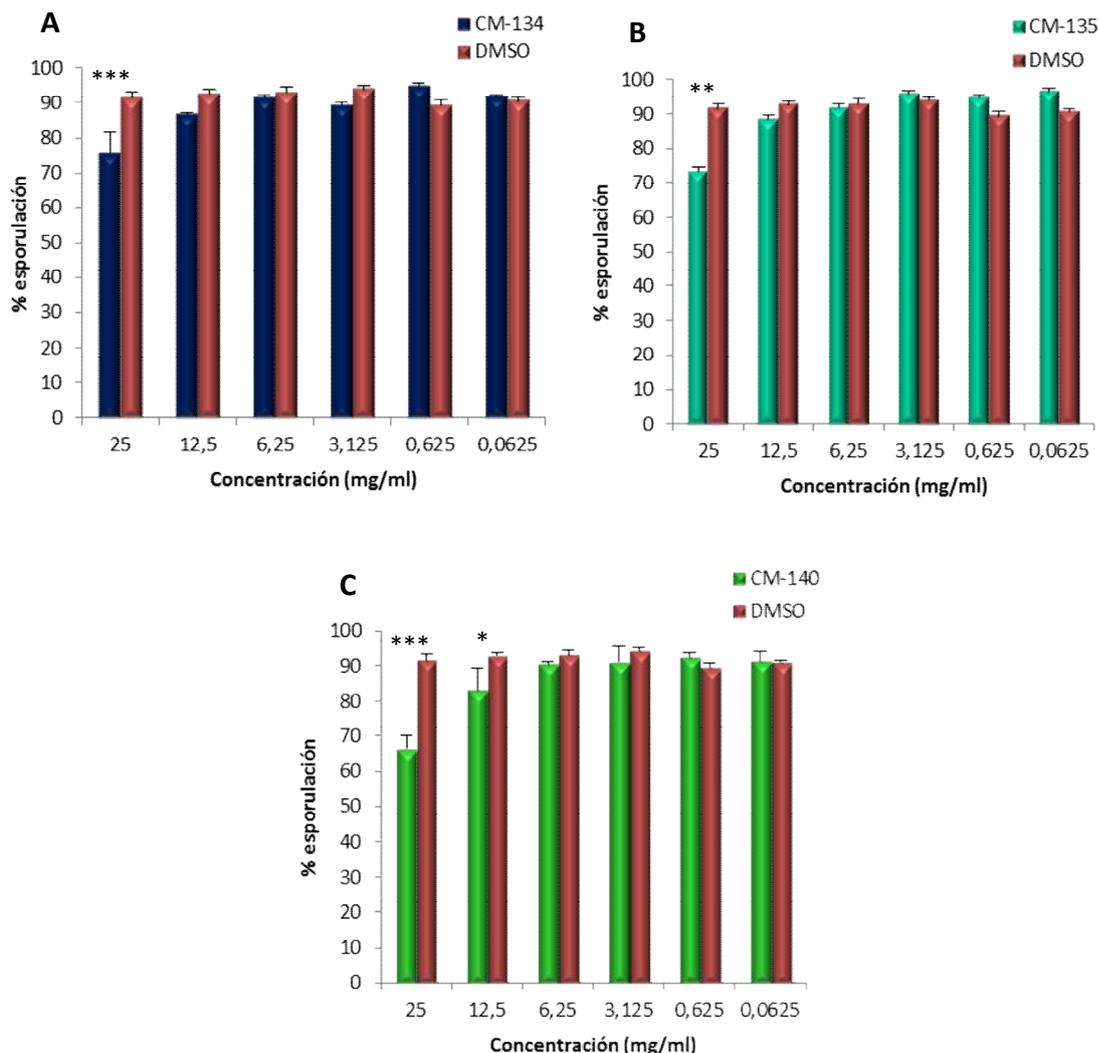
**Figura 17.** Ensayo de inhibición de la esporulación de ooquistes. Se evaluó el efecto anticoccidiósico de extracto acuoso de frutos maduros de *R. pinnata* (Aq FrM Rp) 24 horas después del lavado. Como control positivo se usó formaldehído 10% y como control negativo DMSO a diferentes concentraciones. Significación estadística  $P < 0,01$  (\*\*).

#### 5.1.2.1.3. Evaluación de la actividad anticoccidiósica de compuestos elaborados a partir de cultivos *in vitro* de *Ruta pinnata*

Todos los extractos de cultivos *in vitro* de material vegetal de *Ruta pinnata* procedentes de los tres ensayos no mostraron una actividad anticoccidiósica relevante, siendo los resultados obtenidos prácticamente iguales al control negativo utilizado, excepto para la mayor concentración de extracto utilizada (25 mg/ml). A esta concentración, los extractos CM-134 y CM-135 mostraron un porcentaje de ooquistes esporulados en torno al 70 %, significativamente menor que el encontrado en los correspondientes controles negativos ( $P < 0,001$  y  $P < 0,01$ , respectivamente) (**Fig. 18A y Fig. 18B**). También se observaron diferencias significativas al comparar el extracto CM-140 con los controles negativos a concentraciones de 25 mg/ml (65 % de esporulación,  $P < 0,001$ ) y 12,5 mg/ml (83 % esporulación,  $P < 0,05$ ). Sin embargo, a partir de esta concentración el porcentaje de esporulación aumentó progresivamente hasta ser prácticamente igual al del control negativo (**Fig. 18C**).

La dosis eficaz 50 (dosis a la cual el 50 % de los ooquistes están esporulados) para los tres extractos *in vitro* fueron muy elevadas en comparación con obtenidas para los extractos naturales: 78,81 mg/ml, 60,83 mg/ml y 48,90 mg/ml para los extractos CM-134, CM-135 y CM-140, respectivamente.

## RESULTADOS



**Figura 18.** Ensayo de inhibición de la esporulación de ooquistes. Se evaluó la actividad anticoccidiósica de compuestos elaborados a partir de cultivos *in vitro* de *R. pinnata* a diferentes concentraciones después de 24 horas de incubación. CM-134, extracto metanólico elaborado a partir de un cultivo *in vitro* en medio nutritivo MSe (A); CM-135, extracto metanólico de un cultivo *in vitro* de células de *Ruta pinnata* en medios nutritivos MS6 y MS3 (B) y CM-140; extracto metanólico elaborado a partir de un cultivo *in vitro* de material vegetal de *Ruta pinnata* (C). Como control positivo se usó formaldehído al 10% y como control negativo DMSO a diferentes concentraciones. Significación estadística  $P < 0,001$ (\*\*\*),  $P < 0,01$  (\*\*) y  $P < 0,05$  (\*).

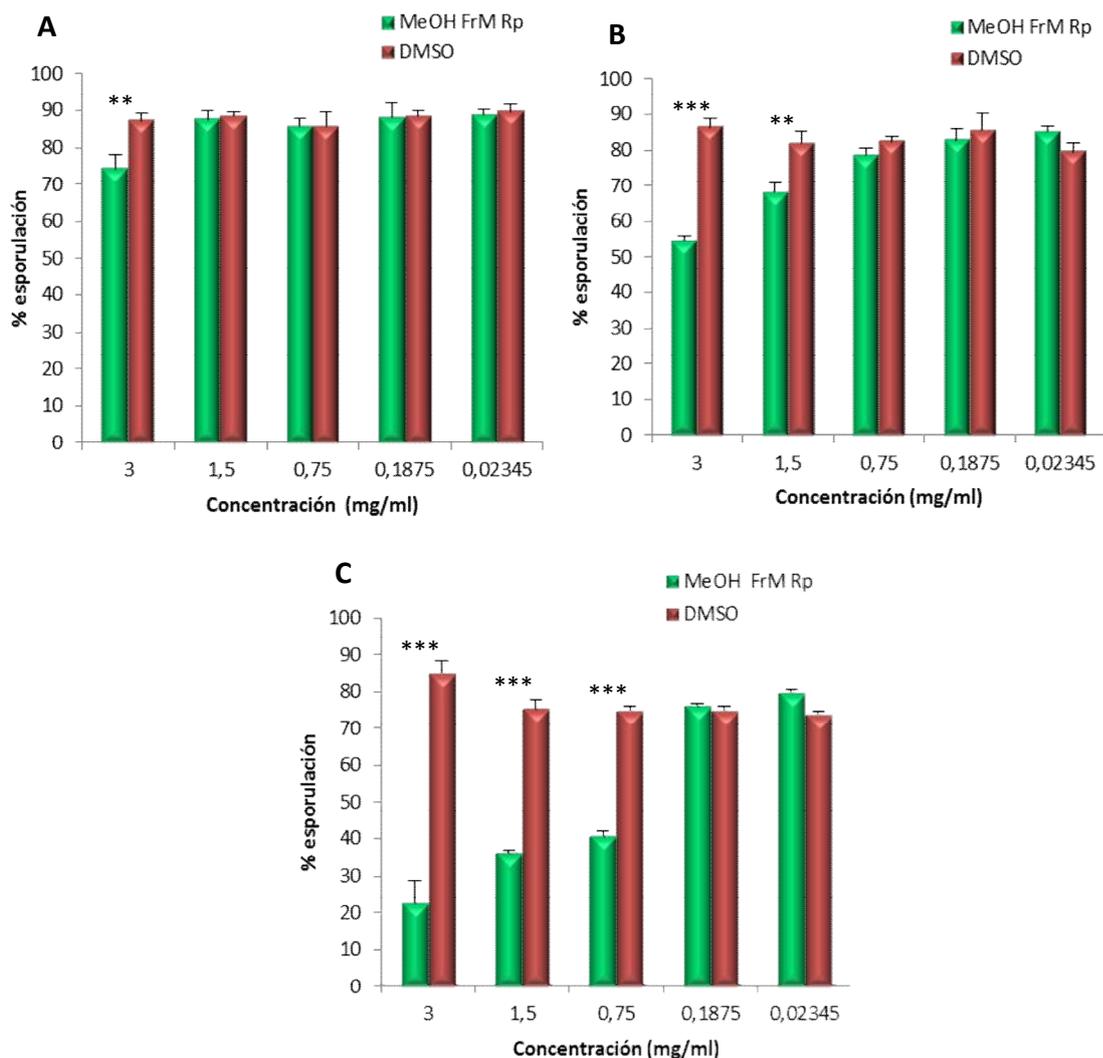
### 5.1.2.1.4. Estudio dosis-dependiente de la actividad anticoccidiósica en diferentes periodos de incubación

La capacidad del extracto metanólico de frutos maduros de *Ruta pinnata* (MeOH FrM Rp) y del compuesto CM-475.3 (fracción de acetato de etilo obtenido a de un compuesto metanólico elaborado a partir de un cultivo *in vitro* de material vegetal de *Ruta pinnata*) para inhibir la esporulación de ooquistes de *E. ninakohlyakimovae* se evaluó, en un estudio dosis-dependiente, a distintos periodos de incubación: 30 minutos, 4 y 24 horas.

En la **Figura 19** se observa cómo el extracto metanólico aumentó su actividad a medida que aumentó el periodo de incubación desde 30 minutos hasta 24 horas. Tras 30 minutos de incubación (**Fig. 19A**), el número de ooquistes esporulados fue similar al del control negativo en todas las concentraciones utilizadas, excepto a 3 mg/ml, concentración a la que se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,01$ ). Cuando el periodo de incubación se incrementó hasta 4 horas, las diferencias con respecto al control negativo se observaron a 3 y 1,5 mg/ml, concentraciones a las que el porcentaje de ooquistes esporulados fue cercano al 50 %. Sin embargo, a partir de 0,75 mg/ml, los porcentajes de esporulación fueron similares a los encontrados para las correspondientes concentraciones de DMSO (**Fig. 19B**).

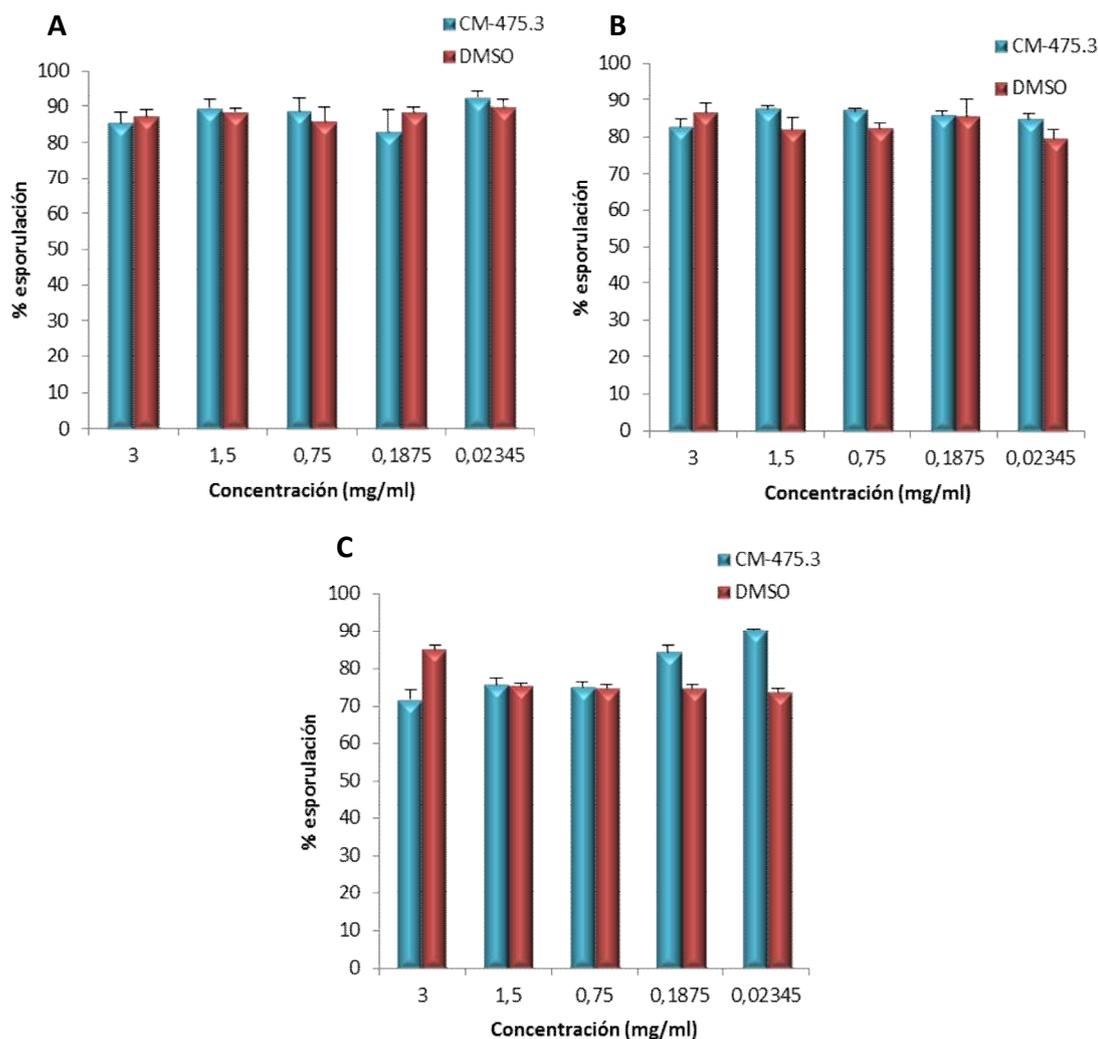
Después de 24 horas de incubación (**Fig. 19C**), la actividad del extracto metanólico de frutos maduros de *Ruta pinnata* aumentó considerablemente, alcanzándose porcentajes de ooquistes no esporulados en torno al 80 % a una concentración de 3 mg/ml ( $P < 0,001$ ). Un mismo grado de significación se encontró, incluso, a 0,75 mg/ml, concentración a la que el número de ooquistes esporulados no superó el 40 %. Esta actividad fue comparable a la del formaldehído al 10% utilizado como control positivo (datos no mostrados). A concentraciones menores no se observaron diferencias con respecto al control negativo utilizado.

La diferencia de actividad en función del tiempo de exposición de los ooquistes a los extractos también se observó al calcular la dosis eficaz. A los 30 minutos de incubación no fue posible hacer el cálculo de la DL50 debido a las características de la curva obtenida; después de 4 horas de exposición al extracto la dosis necesaria para provocar la inhibición del 50 % de los ooquistes fue de 3,644 mg/ml, disminuyendo hasta 0,88 mg/ml cuando el tiempo de incubación se extendió hasta las 24 horas.



**Figura 19.** Ensayo de inhibición de la esporulación de oocistos. Se evaluó el efecto dosis dependiente de la actividad anticoccidiósica del extracto metanólico de frutos maduros de *R. pinnata* (MeOH FrM Rp) a diferentes concentraciones tras 30 minutos **(A)**, 4 horas **(B)** y 24 horas de incubación **(C)**. Como control positivo se usó formaldehído al 10% y como control negativo DMSO a diferentes concentraciones. Significación estadística  $P < 0,001$ (\*\*\*) y  $P < 0,01$  (\*\*).

Los resultados obtenidos con el compuesto CM-475.3 se representan en la **Figura 20**. Dicho extracto no mostró actividad anticoccidiósica significativa prácticamente en ninguna de las concentraciones ensayadas y, por tanto, no se encontraron diferencias de efecto inhibitorio de la esporulación entre los distintos periodos de incubación. Únicamente se produjo un ligero descenso del número de oocistos esporulados después de 24 horas de incubación a 3 mg/ml, concentración a la que el porcentaje de oocistos esporulados fue del 70 % en comparación con el 85% encontrado en el correspondiente control negativo; sin embargo, esta disminución no fue significativa.

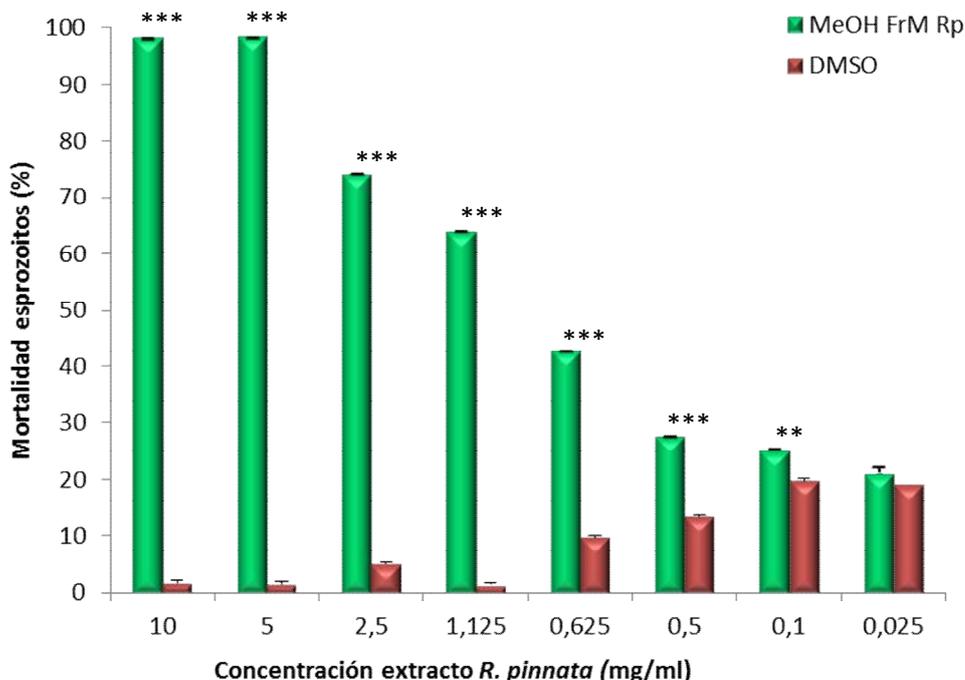


**Figura 20.** Ensayo de inhibición de la esporulación de ooquistes. Se evaluó efecto dosis dependiente de la actividad anticoccidiósica del compuesto CM-475.3 (fracción de acetato de etilo del extracto metanólico del cultivo inicial CM-475) a diferentes concentraciones tras 30 minutos (A), 4 horas (B) y 24 horas de incubación (C). Como control positivo se usó formaldehído al 10% y como control negativo DMSO a diferentes concentraciones.

### 5.1.2.2. Ensayo de viabilidad de esporozoítos

Este ensayo permitió evaluar el efecto de los extractos naturales sobre la forma infectante de *E. ninakohlyakimovae* y así frenar el comienzo del ciclo endógeno. Para tal fin se evaluó la actividad anticoccidiósica del extracto metanólico de frutos maduros de *R. pinnata* (MeOH FrM Rp). El efecto sobre los esporozoítos de *E. ninakohlyakimovae* fue dosis dependiente (DL50: 0,48 mg/ml), tal y como muestra la **Figura 21**. Después de 3 horas de incubación y a concentraciones de 10 y 5 mg/ml se produjo el 100 % de mortalidad de los esporozoítos, el mismo efecto que produjo la acción del calor (control positivo). A partir de estas concentraciones, la actividad anticoccidiósica del extracto disminuyó progresivamente hasta llegar al 20 % de mortalidad a 0,025 mg/ml, concentración a la cual no se observó ninguna diferencia

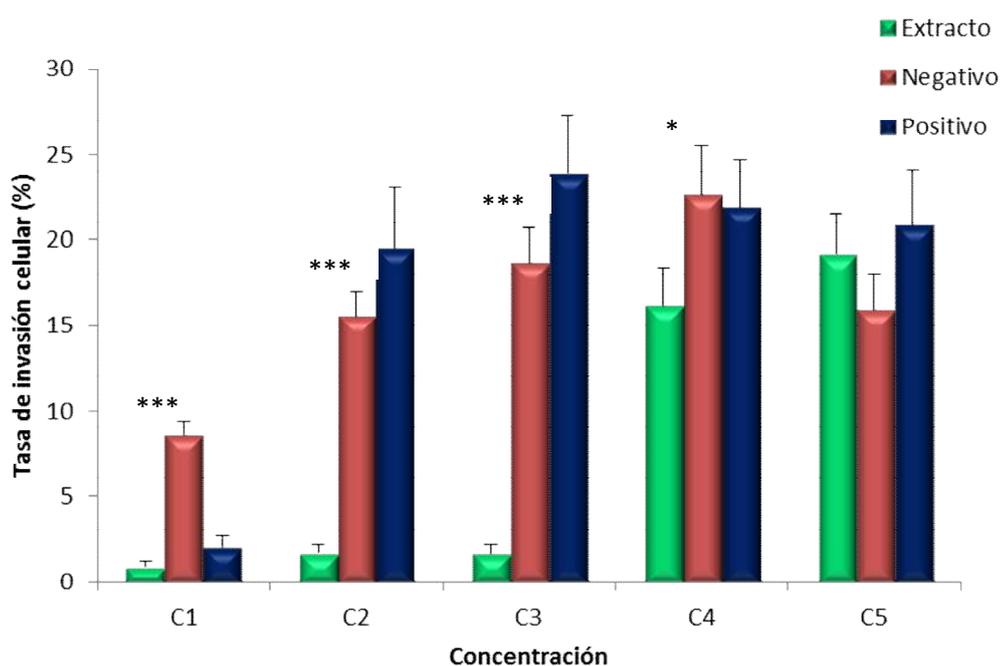
significativa respecto al control negativo. La actividad de dicho extracto sí fue significativa ( $P < 0,001$ ) desde 10 mg/ml hasta 0,5 mg/ml, destacando que a 0,625 mg/ml la mortalidad de los esporozoítos fue cercana al 50 % y que incluso a concentraciones de 0,1 mg/ml se mostraron diferencias significativas ( $P < 0,01$ ) respecto al control negativo utilizado.



**Figura 21.** Ensayo de viabilidad de esporozoítos. Se evaluó el efecto anticoccidiósico del extracto metanólico de frutos maduros de *R. pinnata* (MeOH FrM Rp) a diferentes concentraciones tras 3 horas de incubación. Como control negativo se empleó DMSO. Significación estadística  $P < 0,001$  (\*\*\*) y  $P < 0,01$  (\*\*).

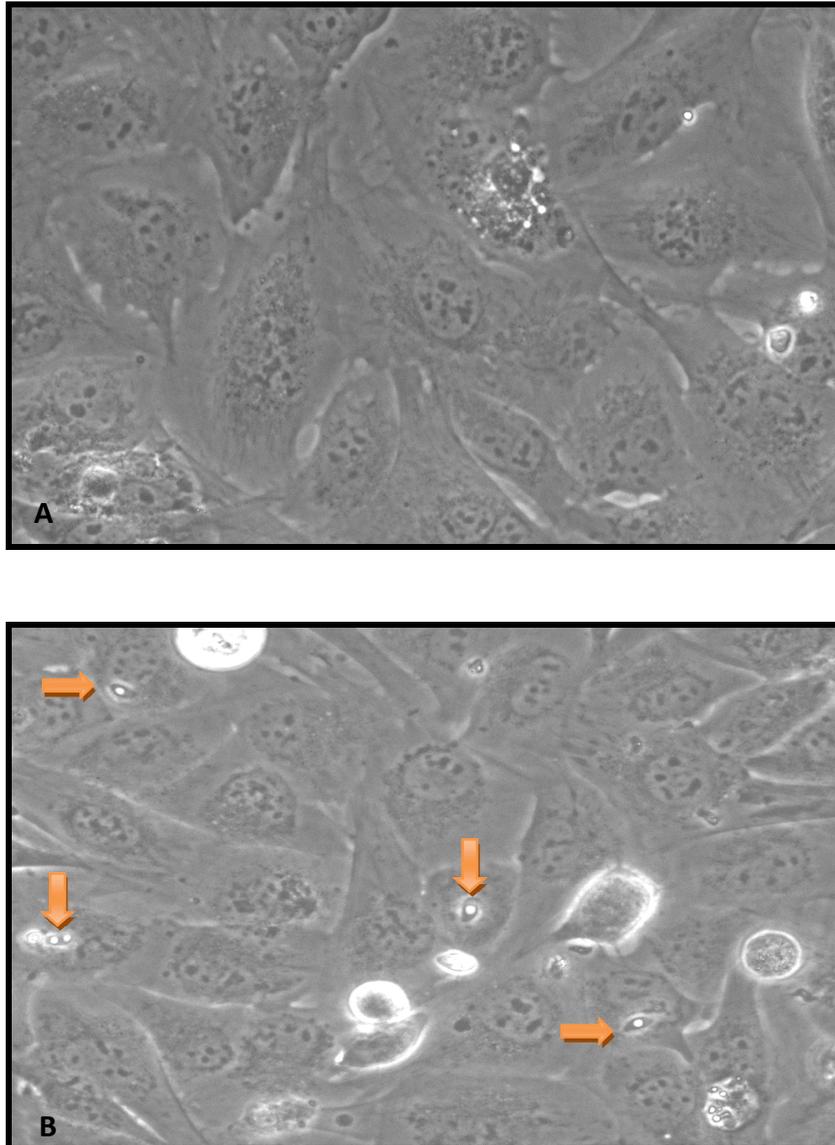
### 5.1.2.3. Ensayo de inhibición de la invasión celular

Con este ensayo se pretendió evaluar si los extractos eran capaces de inhibir la capacidad de los esporozoítos de invadir células cultivadas mediante sistemas *in vitro*. Como en el ensayo anterior, con tal fin se utilizó un extracto metanólico de frutos maduros de *R. pinnata* (MeOH FrM Rp). En la **Figura 22** se representan el porcentaje de células invadidas después de 24 horas de incubación con esporozoítos tratados durante 3 horas con diferentes concentraciones de dicho extracto metanólico, DMSO (control negativo) y sulfadoxina/trimetropin (control positivo).



**Figura 22.** Ensayo de inhibición de la invasión celular. Se evaluó el efecto anticoccidiósico del extracto metanólico de frutos maduros de *R. pinnata* a diferentes concentraciones tras 3 horas de incubación. Como control negativo se empleó DMSO y como control positivo sulfadoxina/trimetropin a diferentes concentraciones. Significación estadística  $P < 0,001$  (\*\*\*) y  $P < 0,05$  (\*).

El porcentaje de células invadidas fue significativamente menor ( $P < 0,001$ ) en los cultivos incubados con esporozoítos tratados, no llegando a superar el 1 % a una concentración de extracto de 5 mg/ml (C1) (**Fig. 23A**). El efecto sobre la capacidad de invasión de los esporozoítos fue destacado hasta 0,5 mg/ml (C3), concentración a la que el porcentaje de células invadidas fue menor del 3 %. A 0,1 mg/ml el número de células invadidas por esporozoítos aumentó hasta valores próximos al 15 %; aun así, las diferencias fueron significativas ( $P < 0,05$ ) (**Fig. 23B**). Únicamente a 0,01 mg/ml, la menor concentración empleada, no se encontraron diferencias respecto al correspondiente control negativo. La incubación de los esporozoítos, con distintas concentraciones de sulfadoxina/trimetropin durante el mismo periodo de tiempo sólo redujo de forma ligera la capacidad de invasión de los mismos; únicamente a la mayor concentración utilizada (10/2  $\mu\text{g/ml}$ ) se observó niveles de invasión similares al extracto y significativamente menores que los del control negativo. Tras esta concentración, el porcentaje de células invadidas aumentó hasta mostrar valores prácticamente iguales a los observados para el DMSO (**Fig. 22**).



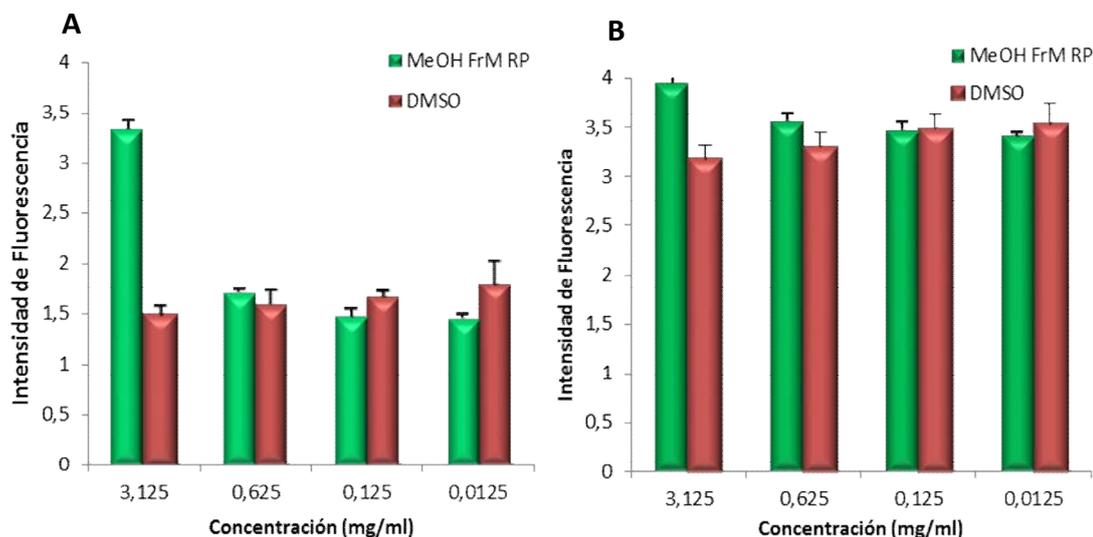
**Figura 23.** Ensayo de inhibición de la invasión celular por esporozoítos de *Eimeria ninakohlyakimovae*. Cultivo *in vitro* de células epiteliales de colon bovino (BCEC). Imagen tomada a 40x después de 24 horas de incubación con esporozoítos tratados con 5mg/ml el extracto metanólico de frutos maduros de *R. pinnata* (A) y esporozoítos sin tratar (control negativo) (B). Se han señalado mediante flechas los esporozoítos que se encuentran en el interior de las células.

## 5.2. EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS

Se realizaron ensayos de citotoxicidad en cultivos celulares *in vitro* tanto en BCECs como en células VERO utilizando el extracto metanólico de frutos maduros de *R. pinnata* con el fin de descartar que la planta pudiera ocasionar daños en el organismo vivo.

Los resultados obtenidos en el ensayo de citotoxicidad mostraron que el extracto utilizado no producía muerte celular significativa en ninguno de los cultivos celulares. A la mayor concentración utilizada de extracto (3 mg/ml) se observó una

intensidad de fluorescencia de 3,34 AU en los cultivos de BCEC (**Fig. 24A**), siendo este valor mayor al DMSO. Sin embargo, a las siguientes concentraciones los valores de intensidad de fluorescencia fueron similares a los correspondientes controles. En el caso de las VERO no existieron diferencias entre el extracto y el control negativo en ninguna de las concentraciones utilizadas, oscilando los valores de intensidad de fluorescencia entre 3,95 y 3,41 AU (**Fig. 24B**).



**Figura 24.** Ensayo de citotoxicidad. Se evaluó el efecto citotóxico del extracto metanólico de frutos maduros de *R. pinnata* a diferentes concentraciones en cultivos *in vitro* de BCEC (**A**) y células VERO (**B**). Como control negativo se empleó DMSO a diferentes concentraciones.

### 5.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA MEDIANTE ENSAYOS *IN VIVO*

Para completar el análisis de la actividad antiparasitaria de *R. pinnata*, se realizó un ensayo *in vivo* con caprinos de 6 meses de edad inoculados experimentalmente con *H. contortus* y *E. ninakohlyakimovae* y que, posteriormente, se trataron con dos tipos de extractos: extracto metanólico de frutos maduros de *Ruta pinnata* (CM-480) y extracto procedente de un cultivo *in vitro* de la planta (CM-472).

Con el objeto de evaluar la actividad antiparasitaria *in vivo* de ambos extractos se monitorizó la sintomatología que presentaron los diferentes grupos de animales, el número de huevos por gramo de heces (HPG), el número de ooquistes por gramo de heces (OPG) y la identificación de las diferentes especies de *Eimeria* presentes en las muestras de heces.

#### 5.3.1. SINTOMATOLOGÍA

Para la evaluación de la sintomatología se observaron tanto el estado general del animal (estado corporal, mucosas...) como la consistencia de las heces (**Tabla 24**).

Los animales del grupo E (animales no inoculados) fueron tomados como controles de la experiencia. Éstos no mostraron ningún síntoma o cambio en el estado de las heces durante el ensayo.

Como se observa la **Figura 24**, los animales pertenecientes al grupo D (inoculados y no tratados) mostraron una clínica severa durante toda la experiencia. En la mayoría de ellos se produjo una disminución del peso corporal y algunos presentaban, incluso, edema submandibular. Además, las mucosas, tanto la bucal como la conjuntival, presentaban una coloración blanquecina, debido a la anemia provocada por la acción hematófaga de *H. contortus*. Todos animales presentaron un cuadro diarreico con heces líquidas verde amarillentas que, en ocasiones, tenían un tinte sanguinolento o estaban acompañadas de restos de la mucosa intestinal.

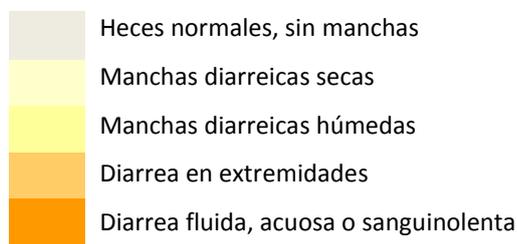


**Figura 24.** Estado general de los animales pertenecientes al grupo D (animales inoculados y no tratados).

En la primera fase de la experiencia, los animales del grupo C (inoculados y tratados con antiparasitarios comerciales) presentaron cuadros diarreicos graves y un gran deterioro de la condición corporal, llegando a morir algunos animales. Después del tratamiento con ivermectina y diclazuril remitieron todos los síntomas, los animales comenzaron a recuperarse y desaparecieron las diarreas pocos días después. En general, los animales del grupo A (animales inoculados y tratados con el extracto metanólico de frutos maduros de *Ruta pinnata*) presentaron una clínica entre moderada y grave, con diarreas al comienzo de la experiencia que desaparecieron después del tratamiento. Una situación clínica similar se observó en los animales pertenecientes al grupo B (animales inoculados y tratados con el extracto CM-472). Las diarreas con tinte sanguinolento se intercalaron con la presencia de hemorrágicas con heces pastosas durante la primera fase del experimento y al final del experimento la mayoría de los animales recuperaron su estado corporal y los síntomas desaparecieron por completo. Los signos clínicos mostrados en los grupos A y B fueron los propios de una infección por nematodos y coccidios, no observándose en ninguno de los animales síntomas compatibles con intoxicación debida a la administración de los extractos.

DÍAS POST-INFECCIÓN	GRUPOS				
	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C	GRUPO D	GRUPO E
28					
29					
30					
31					
32					
33					
34					
35					
36					
37					
38					

**Tabla 24.** Características de la diarrea en los diferentes grupos experimentales: animales inoculados y tratados con el extracto metanólico de frutos maduros de *R. pinnata* (A); animales inoculados y tratados con el extracto CM-472 (B); animales inoculados y tratados con ivermectina y diclazuril (C); animales inoculados y no tratados (D); animales no inoculados (E). La evaluación de la diarrea se determinó utilizando el siguiente criterio:

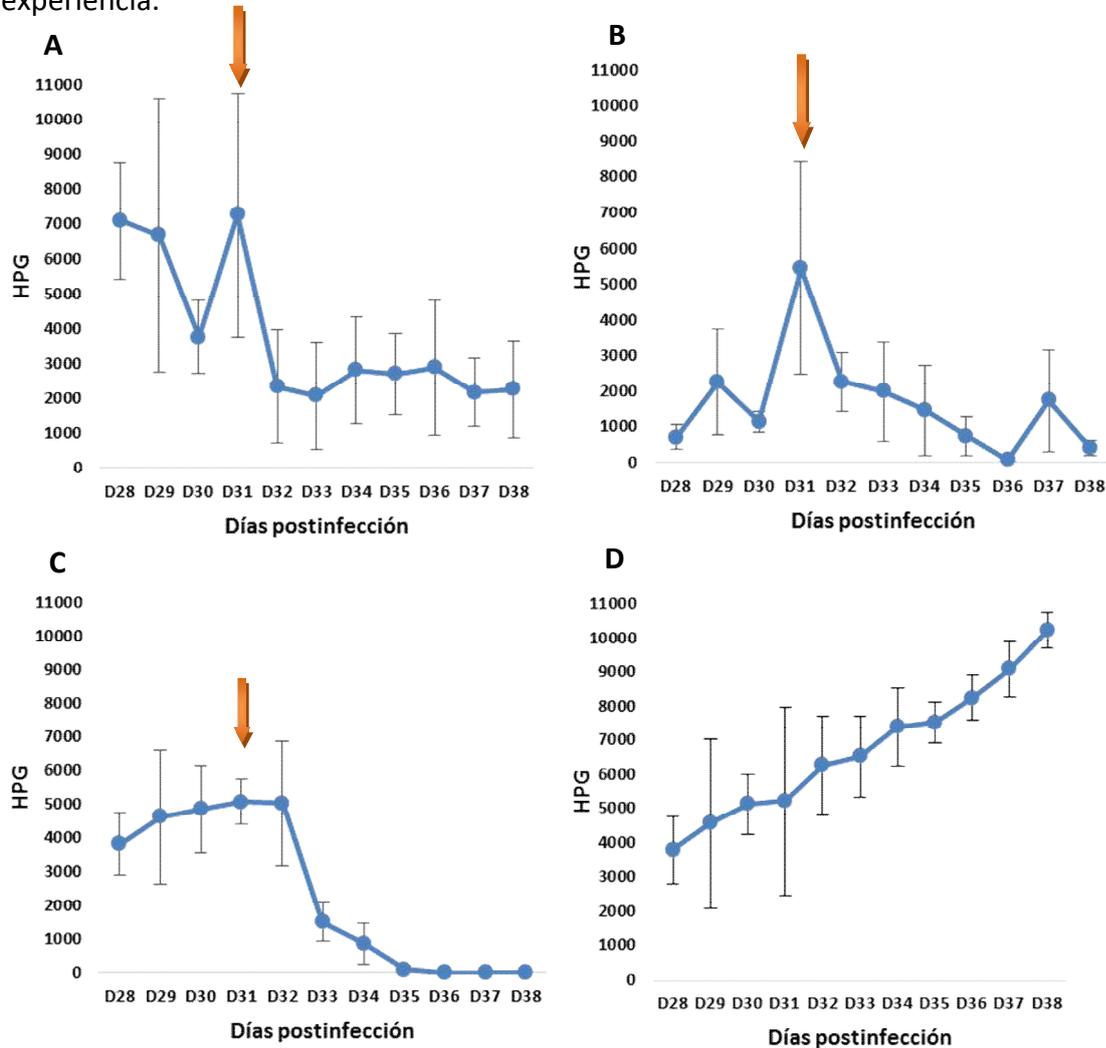


### 5.3.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA

En la **Figura 25** se muestran los recuentos de huevos por gramos de heces (HPG) de los diferentes grupos experimentales a partir del día 28 postinfección (p.i.). Se observó que los animales pertenecientes al grupo D (**Fig. 25D**), animales infectados y no tratados, presentaron recuentos de aproximadamente 3800 HPG en el día 28. En los días siguientes, y hasta el día 38 p.i., el número de huevos eliminados aumentó hasta recuentos superiores a 10000 HPG. Al igual que en el caso anterior, los animales del grupo C mostraron alrededor de 4000 HPG el día 28 y este valor aumentó hasta el día 32, llegando a ser los recuentos de HPG cercanos a 5000. El número de huevos comenzó a disminuir dos días después del tratamiento con ivermectina (día 31 después de la infección) hasta llegar a 0 el día 36 (**Fig. 25C**). En los grupos A y B (**Fig. 25A y Fig. 25B**) la eliminación de huevos siguió una tendencia similar, aunque se diferenciaron en el HPG, que fue mayor en los animales pertenecientes al grupo A. En

## RESULTADOS

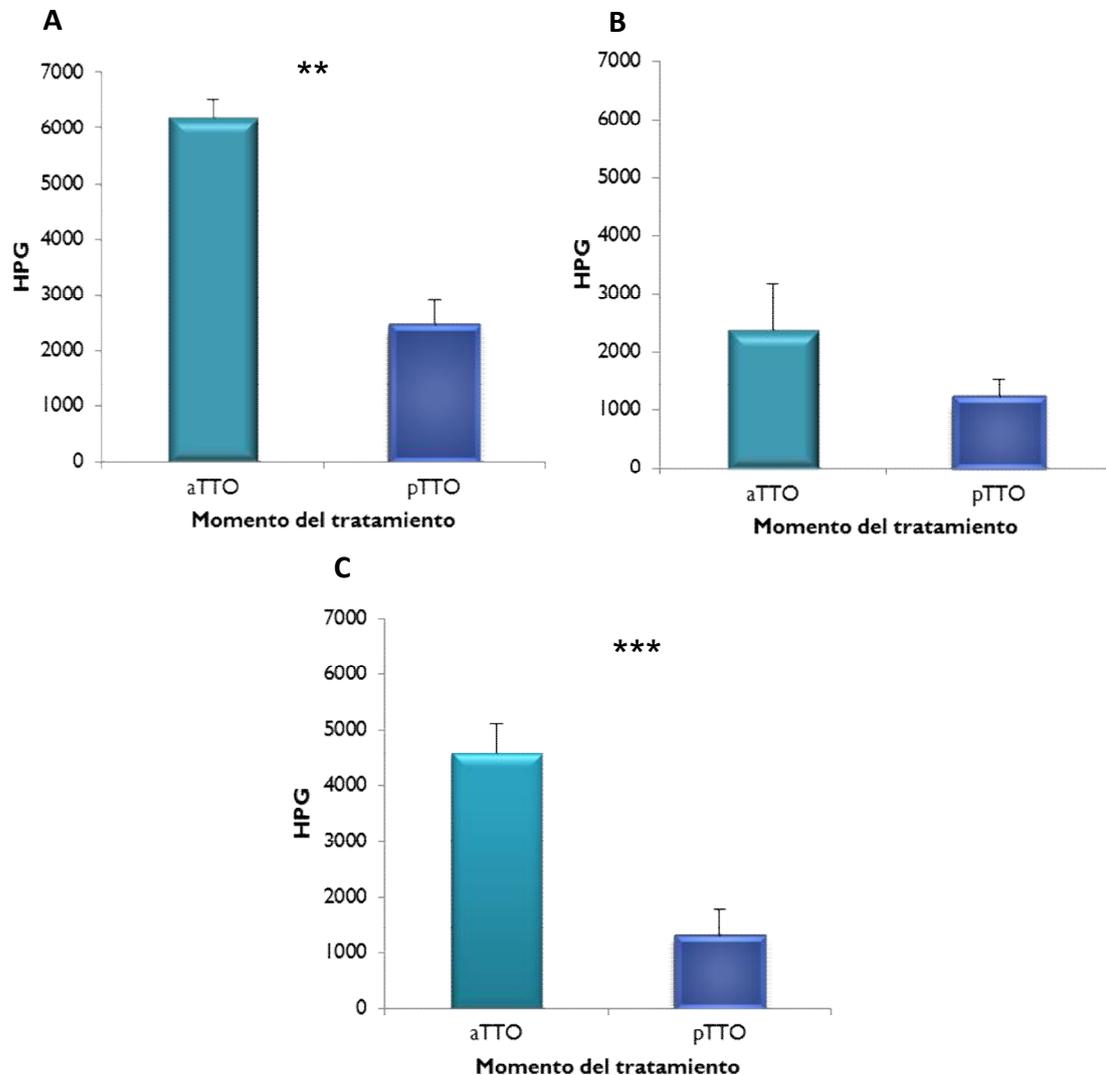
ambos grupos se observó un máximo de eliminación de huevos el día 31, que coincidió con el día del tratamiento con los extractos. Después de la administración de los extractos, el HPG disminuyó drásticamente hasta mantenerse prácticamente constante entre 1000 y 2000 huevos por gramo de heces hasta el final de la experiencia.



**Figura 25.** Recuento de huevos por gramo de heces (HPG) en los diferentes grupos experimentales: animales inoculados y tratados con el extracto metanólico de frutos maduros de *R. pinnata* (A); animales inoculados y tratados con el extracto CM-472 (B); animales inoculados y tratados con ivermectina y diclazuril (C) y animales inoculados y no tratados (D). Las flechas indican el momento del tratamiento.

A continuación se muestran las diferencias entre los recuentos de huevos por gramo de heces antes y después del tratamiento. Estos valores fueron calculados como las medias de los cuatro días antes y siete días después de la administración del tratamiento. Las diferencias entre los recuentos antes y después del tratamiento con ivermectina fueron significativas ( $P < 0,001$ ). Tal y como puede apreciarse en la **Figura 26C**, el tratamiento redujo el número de huevos desde 4500 hasta aproximadamente 1000. Por su parte, el extracto metanólico de fruto maduro de *Ruta pinnata* (grupo A) redujo los recuentos desde 6000 hasta 2500, también de forma significativa ( $P < 0,003$ )

(Fig. 26A). Sin embargo, estas diferencias no se encontraron al comparar los recuentos de huevos por gramo de heces en el grupo B antes y después del tratamiento. En este caso, la disminución del número de huevos no fue tan destacada, a pesar de que los recuentos medios tras el tratamiento también estuvieron próximos a 1000 (Fig. 26B).

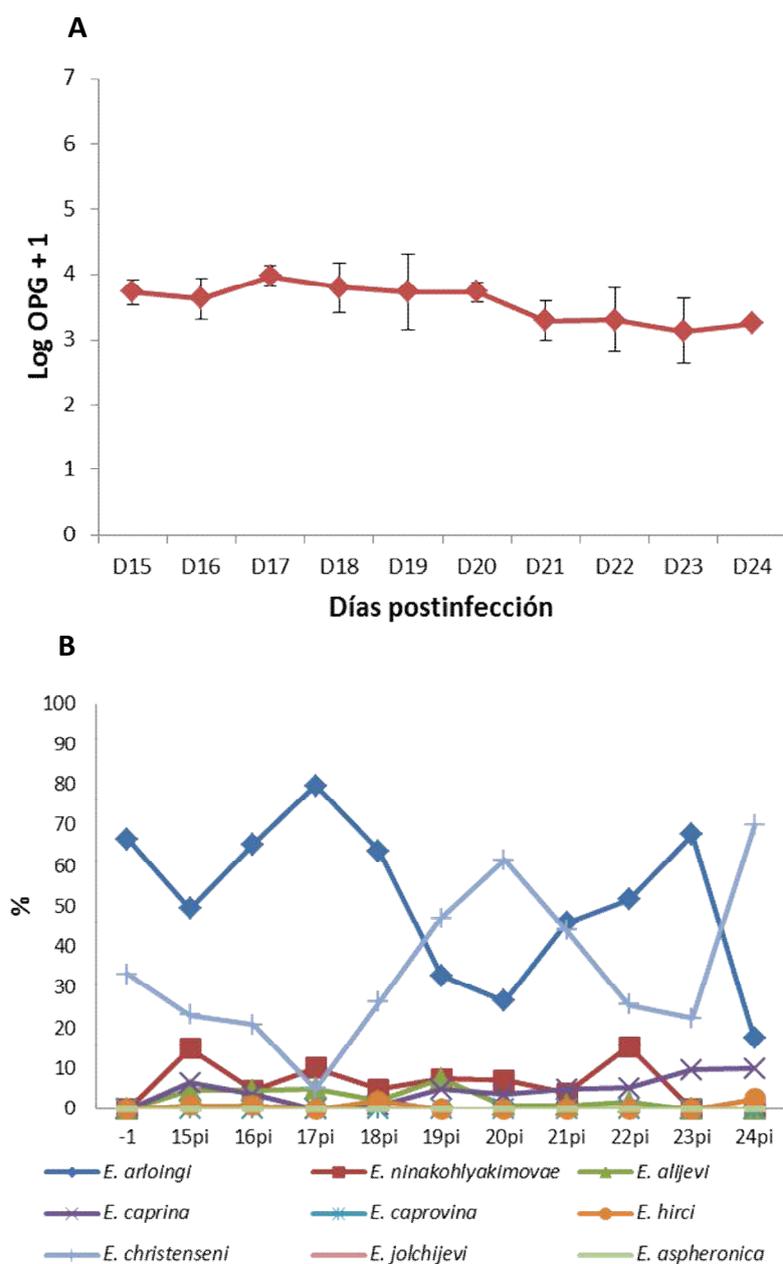


**Figura 26.** Recuento medio HPG antes y después del tratamiento en los grupos experimentales A (animales inoculados y tratados con el extracto metanólico de frutos maduros de *R. pinnata*) (A), B (animales inoculados y tratados con el extracto CM-472) (B) y C (animales inoculados y tratados con ivermectina y diclazuril) (C). Significación estadística  $P < 0,001$  (\*\*\*) y  $P < 0,003$  (\*\*).

### 5.3.3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTICOCCIDIÓSICA

Para evaluar la actividad anticoccidiósica de los extractos *in vivo* se realizaron recuentos de ooquistes por gramos de heces (OPG) desde los días 14 y 24 después de la infección con *Eimeria ninakohlyakimovae*.

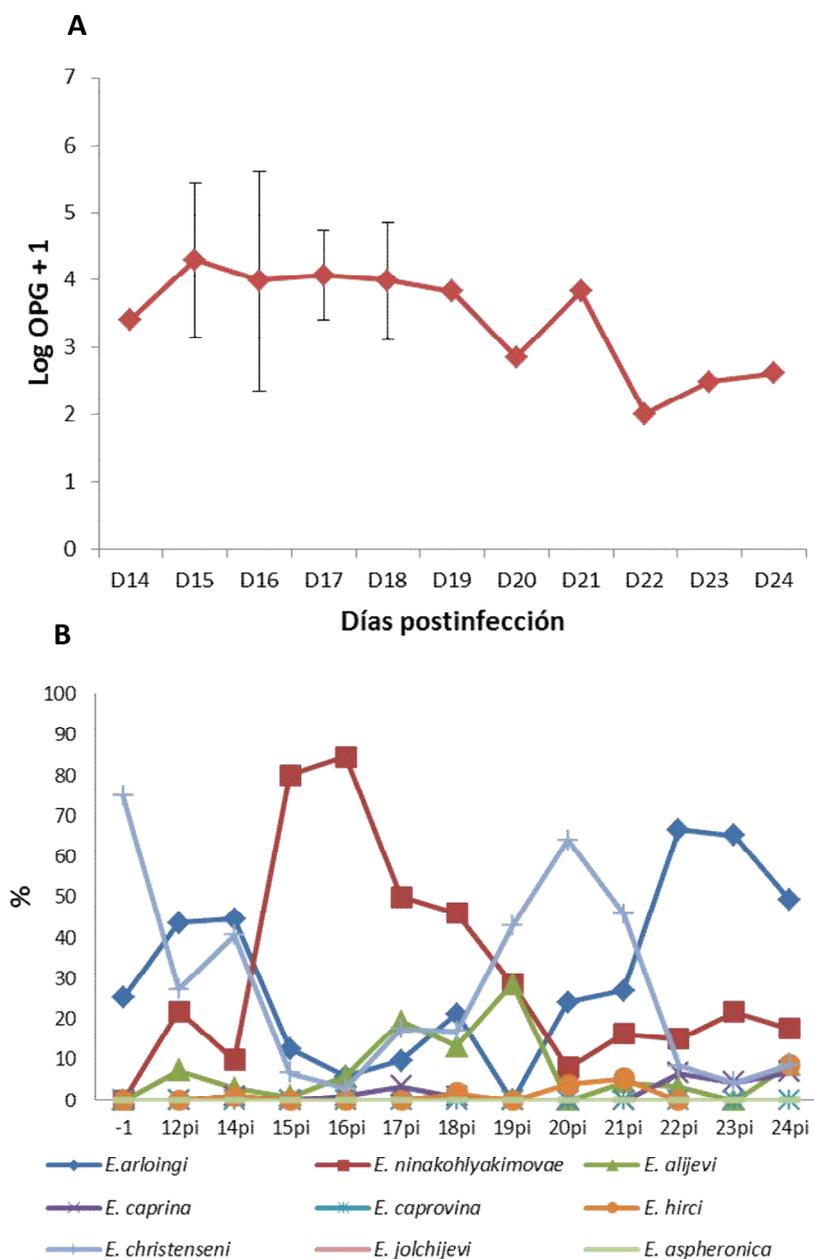
El número de ooquistes que eliminaron los animales de grupo E (controles no infectados) se mantuvo en valores cercanos a 4300 OPG durante toda la experiencia (**Fig. 27A**). Este recuento correspondió a la población natural de ooquistes que presentaban los animales en la granja, por lo que este valor se consideró el control respecto a los recuentos en los demás grupos. El resto de grupos, todos ellos inoculados, mostraron recuentos más altos que el grupo control, pero con diferencias entre ellos. En la población de coccidios propia de la granja donde se realizó el experimento pudo constatararse que las especies mayoritarias eran *E. arloingi* y *E. christenseni* (**Fig. 27B**), siendo su frecuencia elevada durante prácticamente todo el experimento. El resto de especies que se encontraron fueron *E. alijevi*, *E. ninakohlyakimovae* y *E. caprina*, entre otras, pero su porcentaje no superó el 20 % en ninguno de los casos.



**Figura 27.** Recuento de ooquistes por gramo de heces (A) y especiación (B) correspondientes al grupo E (animales no inoculados ni tratados).

Los animales que fueron inoculados y no tratados (grupo D) llegaron a eliminar hasta 17000 OPG desde el día 14 hasta el día 19 postinfección (p.i.). A partir de este día, el nivel de ooquistes disminuyó de forma natural y se mantuvo entre 3000 y 4000 OPG hasta que finalizó el experimento (Fig. 28A). Al igual que en el grupo control, las especies de *Eimeria* predominantes fueron *E. arloingi* y *E. christenseni*. Sin embargo, en este grupo se produjo un aumento del recuento de *Eimeria ninakohlyakimovae* con un pico de eliminación de ooquistes entre los días 15 y 16 p.i. El porcentaje de ooquistes de esta especie se mantuvo elevado hasta el día 19 p.i. y, a partir de ese

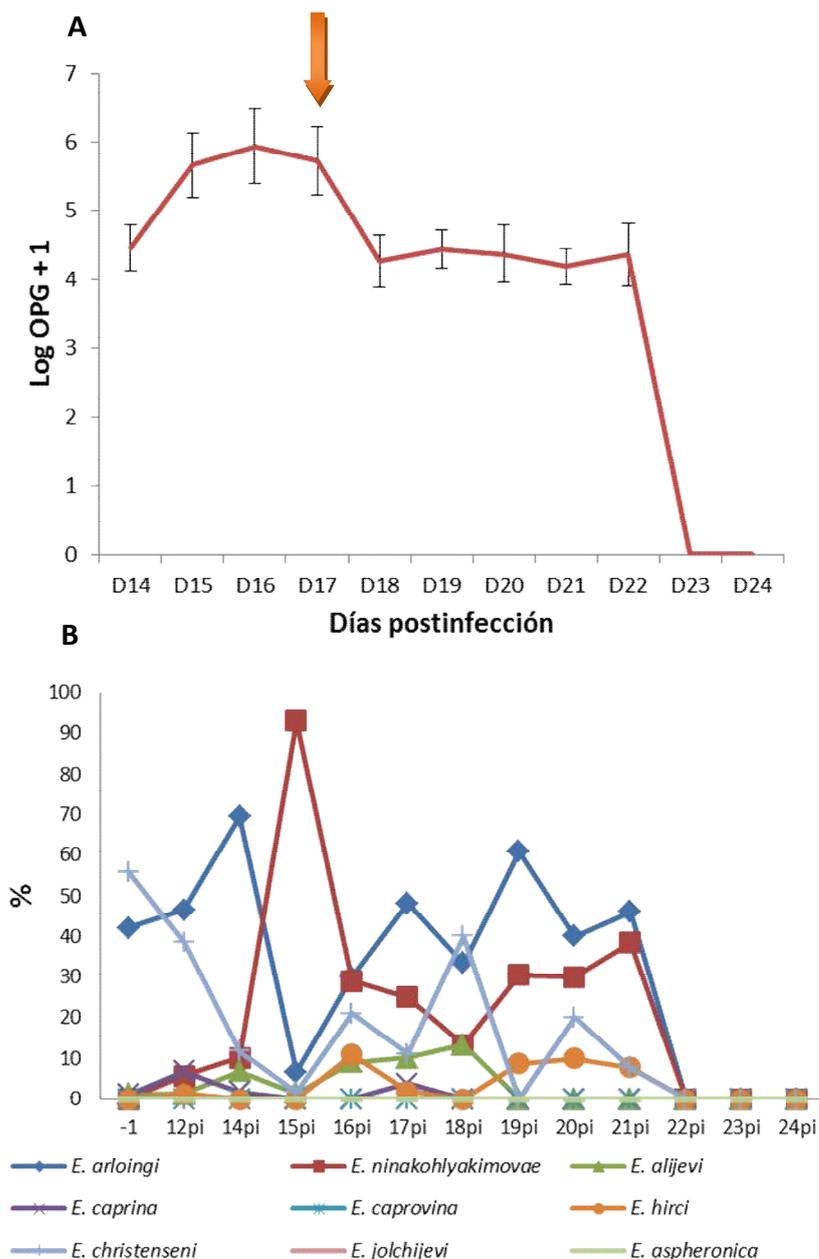
momento los recuentos disminuyeron hasta los valores encontrados en el grupo control (**Fig. 28B**).



**Figura 28.** Recuento de ooquistes por gramo de heces (**A**) y especiación (**B**) correspondientes al grupo D (animales inoculados y no tratados).

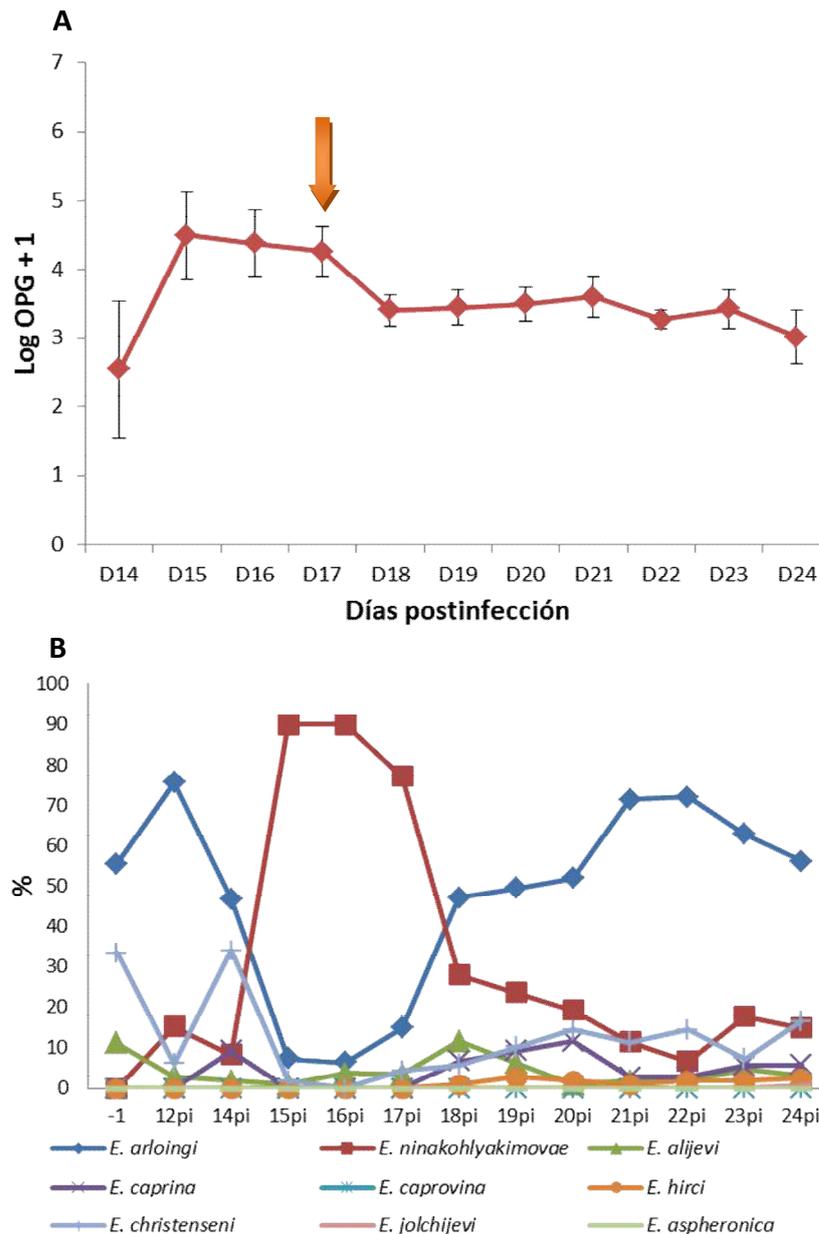
Los recuentos de ooquistes en el grupo C (animales inoculados y tratados con diclazuril) se mantuvieron elevados hasta el día 22 p.i., con valores máximos cercanos a los 83000 ooquistes por gramo de heces. Tras el tratamiento con el anticoccidiósico comercial en el día 17 p.i. se produjo una disminución de los recuentos de OPG, desde 224000 ooquistes hasta 3751 (día 18 postinfección); a partir de aquí el número de ooquistes se mantuvo relativamente estable hasta el día 22 p.i., registrándose recuentos negativos en los dos días siguientes (**Fig. 29A**).

La especie encontradas en el Grupo C fueron en su mayoría *E. arloingi* y *E. christenseni* en porcentajes que rondaron el 60 % y el 40 %, respectivamente, durante toda la experiencia. Estos porcentajes variaron únicamente entre los días 14 y 16 p.i., coincidiendo con el pico de eliminación de ooquistes de *E. ninakohlyakimovae*. Los valores máximos de OPG para esta especie se registraron el día 15 p.i., llegando a ser su porcentaje relativo superior al 90 %. A partir de este día la población de coccidios volvió a restablecerse hasta el día 22 postinfección, donde el recuento fue 0 debido a la administración del diclazuril (**Fig. 29B**).



**Figura 29.** Recuento de ooquistes por gramo de heces (**A**) y especiación (**B**) correspondientes al grupo C (animales inoculados y tratados con diclazuril).

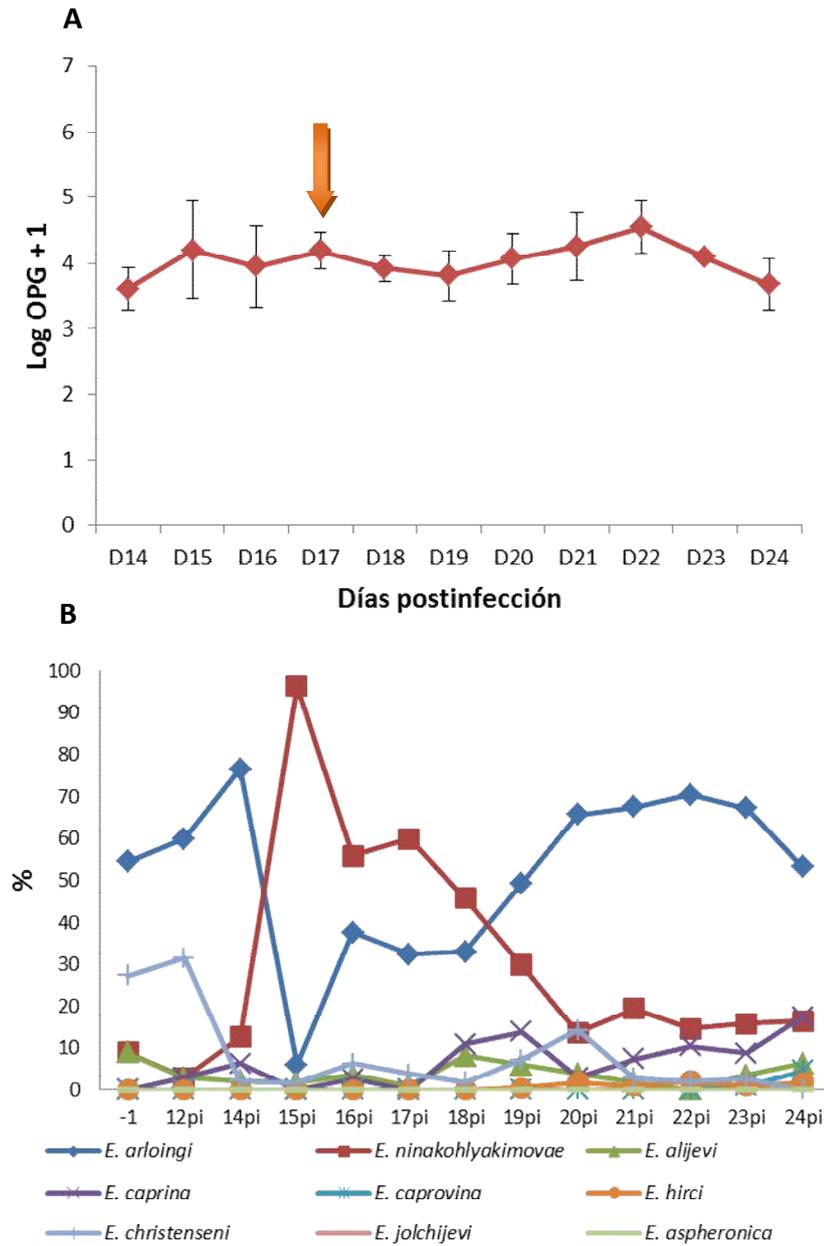
En la **Figura 30** se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad anticoccidiósica *in vivo* del grupo A, constituido por animales que fueron inoculados con *Eimeria ninakohlyakimovae* y tratados el día 17 p.i. con el extracto metanólico de frutos maduros de *Ruta pinnata*. El recuento de ooquistes aumentó de 2208 a 259333 del día 14 al 15 p.i., a continuación descendió ligeramente hasta el día 17Pi, día del tratamiento con el extracto natural. Después de la administración del extracto los recuentos de OPG siguieron disminuyendo y se mantuvieron en torno a 8000 ooquistes por gramo de heces hasta el final de la experiencia (**Fig. 30A**). Los resultados de la especiación demostró que en los animales pertenecientes a este grupo la especie mayoritaria se correspondía con *E. arloingi*. Como en otros grupos infectados, la alta presentación de dicha especie disminuyó entre los días 15 y 17 postinfección coincidiendo con el pico de eliminación de ooquistes de *Eimeria ninakohlyakimovae*. El resto de especies encontradas no superaron el 30 %, entre ellas *E. christenseni* y *E. alijevi*.



**Figura 30.** Recuento de ooquistes por gramo de heces (A) y especiación (B) correspondientes al grupo A (animales inoculados y tratados con el extracto metanólico de frutos maduros de *Ruta pinnata*).

El número de ooquistes se mantuvo relativamente constante durante todo el experimento en el grupo B (animales inoculados y tratados con el extracto CM-472). En la **Figura 31A** se observa que los recuentos se mantuvieron en 60000 ooquistes por gramo de heces, incluso después del tratamiento con el extracto. Los porcentajes de especies reconocidas en el Grupo B fueron similares a los del Grupo A. La especie predominante fue, durante todo el periodo de experimentación, *E. arloingi*. Sólo se observaron menores porcentajes para esta especie en los días donde se produjo el pico de eliminación de ooquistes de *E. ninakohlyakimovae* llegando a ser dicho pico superior al 90 % el día 15 p.i. En el resto de especies diferenciadas la frecuencia de presentación osciló entre 25 % (*E. christenseni*) y 6 % (*E. alijeivi* y *E. caprina*) (**Fig. 31B**).

## RESULTADOS



**Figura 31.** Recuento de ooquistes por gramo de heces (A) y especiación (B) correspondientes al grupo B (animales inoculados y tratados con el compuesto metanólico *in vitro* CM-472).

# Discusión

---



En el presente trabajo se han realizado ensayos *in vitro* e *in vivo* para determinar la actividad antihelmíntica y anticoccidiósica de un gran número de extractos elaborados a partir de plantas pertenecientes a la flora canaria como *Ruta pinnata*, *Psoralea bituminosa* y *Ruta graveolens*. A partir de los resultados obtenidos, también se analizaron estos efectos de extractos procedentes de cultivos *in vitro* de material vegetal de *Ruta pinnata* en distintos medios nutritivos. Constituye el primer trabajo en el cual se han utilizado derivados de las rutáceas propias de la flora canaria para evaluar sus posibles propiedades antiparasitarias frente a nematodos y coccidios que afectan al ganado caprino. Otros autores también han llevado a cabo estudios comparativos con diferentes familias en los cuales se demuestra que ciertas especies pertenecientes a la familia Rutaceae, como *Ruta graveolens*, poseen propiedades antiparasitarias que son frecuentemente utilizadas en la medicina tradicional en el centro de Italia (**Guarrera, 1999**).

Los datos obtenidos de los diferentes ensayos *in vitro*, realizados tanto con el nematodo de pequeños rumiantes *Haemonchus contortus* como con el coccidio *Eimeria ninakohlyakimovae*, demuestran que varios de los extractos utilizados muestran una marcada actividad antiparasitaria, destacando el extracto metanólico elaborado a partir de frutos maduros de *Ruta pinnata*. Dicho extracto presenta una alta actividad, no sólo frente a todos los estados parasitarios de *H. contortus*, sino también frente a diferentes fases del ciclo biológico del coccidio investigado en este estudio. La utilización de este mismo extracto, en los ensayos *in vivo* derivó en una disminución de los recuentos fecales de huevos del nematodo en los animales tratados, pero su efecto no fue tan patente al analizar la actividad anticoccidiósica.

Otros extractos utilizados en el estudio también mostraron una elevada actividad antiparasitaria, aunque no tan marcada como el anterior. Así, en los extractos metanólicos elaborados a partir de plantas enteras de *R. graveolens* y *P. bituminosa* se observó que presentaban diferentes niveles de actividad antihelmíntica, aunque, en general su efecto, no fue tan marcado como el que mostró el extracto homólogo de *Ruta pinnata*. De igual forma, la actividad anticoccidiósica frente a *E. ninakohlyakimovae* fue mayor en *R. pinnata* que en las otras dos plantas.

Los resultados obtenidos con los extractos elaborados con distintos disolventes, así como los elaborados a partir de frutos de *Ruta pinnata* con distinto grado de maduración, fueron variables, destacando la actividad antihelmíntica mostrada por la fracción hexánica de extractos metanólicos. El efecto antihelmíntico de los extractos también varió en función del tipo de cultivo *in vitro* de material vegetal de *Ruta pinnata* empleado. Por ejemplo, los compuestos CM-134 y CM-135 mostraron una importante actividad antihelmíntica, dosis dependiente, tanto frente a larvas como adultos de *H. contortus*, mientras que las fracciones analizadas del compuesto CM-463.1 sólo mostraron una alta actividad frente a las formas larvarias de este nematodo. A diferencia de lo observado en los ensayos realizados con nematodos, la actividad anticoccidiósica de los extractos obtenidos a partir de cultivos *in vitro* de *R. pinnata* no fue tan significativa. Con ninguno de ellos se obtuvo un resultado similar al encontrado en los extractos naturales utilizados en los ensayos *in vitro* con el coccidio ensayado.

Todos estos resultados se discutirán con más detalle a continuación. En primer lugar se analizarán por separado los resultados de los ensayos realizados *in vitro* con nematodos y coccidios y, a continuación, los correspondientes a la experiencia *in vivo*.

## 6.1 ENSAYOS *IN VITRO*

### 6.1.1. ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA

La actividad antihelmíntica de los diferentes extractos fue evaluada mediante ensayos *in vitro* donde se utilizaron distintos estadios del nematodo de pequeños rumiantes *Haemonchus contortus*. Los resultados de los diferentes ensayos (ensayo de eclosión de huevos, desarrollo larvario, parálisis larvaria y viabilidad de adultos) demuestran que los extractos metanólicos de las partes aéreas de las tres plantas seleccionadas poseen, en general, de moderada a alta actividad antihelmíntica. El hecho de que muchos de los extractos analizados tuvieran efecto, tanto frente a huevos, como frente a larvas y adultos del parásito, se considera de gran trascendencia ya que su empleo con fines profilácticos o terapéuticos podría interferir en las diferentes fases del ciclo biológico del parásito.

*Ruta pinnata* mostró una actividad ovicida elevada a concentraciones de 5 mg/ml, con una inhibición de la eclosión de los huevos del 95 %, disminuyendo la actividad de forma dosis dependiente a concentraciones menores. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en el ensayo homólogo realizado con el extracto metanólico de *Ruta graveolens*, en el que se observó que el porcentaje de huevos no larvados estaba próximo al 90 % a una concentración de 1,25 mg/ml; de igual forma, el efecto del extracto disminuyó de forma dosis dependiente. Por el contrario, no se observó actividad ovicida al emplear el extracto homólogo elaborado con partes aéreas de *Psoralea bituminosa*, no superándose más allá del 10 % el porcentaje de huevos no embrionados con ninguna de las concentraciones utilizadas. Numerosos estudios también han valorado la actividad ovicida de diferentes compuestos vegetales frente a los huevos de *H. contortus*, con resultados similares a los encontrados en el presente trabajo. Así, un ensayo realizado por **Macedo et al. (2012)** con extractos elaborados a partir de diferentes plantas pertenecientes a la flora brasileña y utilizadas comúnmente en la medicina tradicional de país mostró, que *Mentha villosa* y *Tagetes minuta* poseen efecto ovicida frente a los huevos de *H. contortus*, inhibiendo su eclosión en un 97,6 y un 96,8 % respectivamente a una concentración de 2,5 mg/ml. Por otro lado, en un estudio donde se analizaron diferentes plantas usadas frecuentemente como terapia natural en Sudáfrica, tres de ellas (*Heteromorpha trifoliata*, *Leucosidea sericea* y *Maesa lanceolata*) presentaron una importante actividad ovicida (**Adamu et al., 2013**). También se ha observado que los extractos elaborados a partir de *Mentha piperita*, *Lippia sidoides* y *Piper tuberculatum* mostraban una actividad ovicida similar al albendazol, fármaco empleado como control positivo del ensayo; por el contrario, los autores no pudieron demostrar ningún efecto antihelmíntico cuando utilizaron la planta *Carapa guianensis* (**Carvalho et al., 2012**).

Dentro del orden Strongylida, al cual pertenece *H. contortus*, lo habitual es que en el ciclo exógeno de *H. contortus* los huevos no embrionados liberados con las heces del hospedador desarrollen en el medio una larva de primer estado en su interior (L1), la cual, tras la eclosión, evoluciona posteriormente a los estados de L2 y L3, siendo esta última larva el elemento infectante (**Urquhart et al., 2001**). La capacidad de los extractos para detener la evolución de los huevos se considera, por tanto, de gran interés, ya que permitiría cortar el ciclo exógeno del parásito y con ello reducir las posibilidades de contagio de otros animales a partir de las larvas 3 del pasto.

Puesto que, tal y como se ha comentado anteriormente, el ciclo evolutivo de *H. contortus* incluye diferentes estados larvarios, aparte del estudio de la actividad ovicida de los extractos, se llevó a cabo una evaluación del efecto larvicida de los mismos. Para ello se realizaron dos tipos de análisis: el ensayo de desarrollo larvario y el ensayo de movilidad larvaria, el primero de ellos para evaluar la actividad sobre los estados larvarios L1 y L2 y el segundo para valorar el efecto de los extractos sobre las L3 infectantes.

El efecto sobre la evolución de las larvas de *H. contortus* de *R. pinnata* fue del 100 % cuando se utilizó la mayor concentración; esta actividad fue disminuyendo a medida que lo hicieron las concentraciones. Aunque la inhibición del desarrollo larvario obtenida no pueda, a priori, considerarse elevada, la DL50 (0,075 mg/ml) del extracto metanólico de *R. pinnata* fue menor que la encontrada en otros estudios realizados con diferentes plantas, como *Heteromorpha trifolia* (DL50 0,64 mg/ml) (**Adamu et al., 2013**). El efecto sobre el desarrollo larvario se observó en todas las concentraciones cuando el ensayo se realizó con el extracto metanólico de *R. graveolens*, llegando a ser estadísticamente significativo hasta 0,02 mg/ml, concentración a la que el número de L3 viables fue menor al 20 %. El efecto larvicida de esta otra rutácea fue, por tanto, destacado. El resultado obtenido en esta prueba con *P. bituminosa* demostró que la planta era capaz de inhibir el desarrollo larvario en un 100% hasta una concentración de 0,08 mg/ml y cercano al 90 % a 0,02 mg/ml. En base a estos resultados, se podría considerar que el extracto metanólico de *P. bituminosa* posee mayor actividad larvicida que las especies de *Ruta*. Sin embargo, durante la realización del ensayo con esta planta se produjo un crecimiento bacteriano en todas las placas utilizadas, por lo que no se podría afirmar que la alta actividad antihelmíntica encontrada fuese debida al extracto en sí. Se desconoce el porqué de este sobrecrecimiento bacteriano, ya que todos los extractos utilizados fueron elaborados de la misma forma. No obstante, puesto que *P. bituminosa* es comúnmente utilizada como forraje para el ganado debido a su alto valor nutritivo, no sería descartable que los extractos de la planta pudieran haber constituido un estimulante del crecimiento de las bacterias ya existentes en el filtrado de huevos.

A parte del efecto ovicida y larvicida, es importante reseñar la actividad que presentaron los extractos de plantas enteras como adulticida, considerándose el efecto más destacado, ya que, a bajas concentraciones, todos ellos produjeron altos porcentajes de mortalidad de los vermes. Así, los porcentajes de disminución de la viabilidad de los adultos fueron superiores al 50 % a una concentración de 0,25 mg/ml

después de 24 horas de incubación con *P. bituminosa* y *R. graveolens*, siendo menor la actividad adulticida de *R. pinnata*, la cual mostró un efecto vermícida superior al 80 % a una concentración de 5 mg/ml. Aparentemente, según los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad de adultos, se podría considerar que los extractos metanólicos de *R. graveolens* y *P. bituminosa* presentaron mayor actividad adulticida que el mismo extracto de *R. pinnata*. Sin embargo, estos resultados han de interpretarse con precaución ya que en los ensayos realizados con las dos primeras plantas se obtuvieron valores de mortalidad elevados (superiores al 30 %) en todas las concentraciones utilizadas en el control negativo (DMSO), por lo que parte de los porcentajes de la mortalidad mostrada por los extractos de *R. graveolens* y *P. bituminosa* podría haber sido debida a la muerte natural de los vermes y no al efecto del extracto en sí.

Al igual que en el presente estudio, también se ha demostrado actividad adulticida frente a *H. contortus* utilizando otras plantas. Por ejemplo, los extractos acuoso y etanólico de *Artemisia absinthium*, produjeron la muerte de los vermes en un elevado porcentaje, 73,6 y 94,7 % respectivamente (**Tariq et al., 2009**). De igual forma, los extractos de *Swertia chirata* (**Iqbal et al., 2006**), así como los de *Chenopodium album* y *Caesalpinia crista*, también se ha demostrado que presentan una importante actividad vermícida, siendo capaces de provocar la muerte de los adultos en altos porcentajes (**Jabbar et al., 2007**). Comparando los resultados obtenidos en estos estudios con la actividad adulticida presentada por el extracto de *R. pinnata* a iguales concentraciones (25 mg/ml, por ejemplo), la actividad de la ruta fue considerablemente mayor; en concreto, a dicha concentración se obtuvo una mortalidad de adultos del 100 %. Tampoco los extractos de otras plantas mostraron una actividad adulticida tan alta frente a los vermes adultos de *H. contortus* como *Ruta pinnata*. Así, los extractos metanólico y diclorometano elaborados con semillas de *Curcubita moschata*, a la cual se le atribuye un potente efecto tenicida, mostraron un efecto adulticida que no llegó a superar el 59,2 % tras 24 horas de incubación a la mayor concentración utilizada (**Marie-Magdeleine et al., 2009**). Incluso menor (46 %) fue el porcentaje de mortalidad de adultos inducido por el extracto de diclorometano de hojas de *Musa parasidiaca* (**Marie-Magdeleine et al., 2014**).

Analizando los resultados de los ensayos comentados anteriormente, se puede observar que existen diferencias en la actividad de los extractos en función del estado parasitario utilizado. De acuerdo con esto, los resultados publicados por **Carvalho et al. (2012)**, donde se evaluó la actividad antihelmíntica de diferentes plantas frente a *H. contortus*, demostraron que los extractos de *Hura crepitans* inhibían completamente el desarrollo de las L1 hasta L3, mientras que el efecto ovicida no superó el 16,84 % a concentraciones similares. De igual forma, en el presente trabajo, los extractos de *P. bituminosa* y *R. graveolens* no presentaron una actividad larvívica destacada frente a las L3, según demostraron los resultados del ensayo de movilidad larvaria, y su actividad ovicida fue baja y moderada, respectivamente, sin embargo, ambas plantas sí inhibieron en un elevado porcentaje el desarrollo larvario. Por el contrario, el extracto metanólico de *R. pinnata* presentó porcentajes de parálisis larvaria superiores al 50 % con concentraciones de 0,625 mg/ml, siendo esta actividad significativa hasta 0,0625 mg/ml, mientras el efecto sobre el desarrollo larvario no fue tan destacado.

Finalmente, los extractos metanólicos y acuosos de tallo de *Musa paradisiaca* empleados por **Marie-Magdeleine et al. (2014)**, los cuales no tuvieron ningún efecto sobre la eclosión de los huevos y una actividad adulticida moderada, sí mostraron una actividad larvicida destacada, con porcentajes de inhibición del desarrollo larvario prácticamente iguales a los mostrados por el control positivo.

En su conjunto, la evaluación de los resultados de la actividad antihelmínticas de las tres plantas demuestran que los extractos de la planta entera de *R. pinnata* podrían considerarse como los de mayor actividad, pues no sólo presentan una alta actividad ovicida y larvicida importante (en particular en lo referente a las L3 infectantes) sino que, además, disminuyen la viabilidad de los vermes adultos de *H. contortus*. Por tanto, la planta podría emplearse tanto para reducir la carga infectante en el medio como para abortar infecciones. Una importante actividad larvicida también se ha demostrado en compuestos procedentes de otras plantas, como los flavonoides procedentes de *Struthida argentea*, cuya actividad larvicida llegó a ser de un 90 % a muy bajas concentraciones (**Ayers et al., 2008**). Igualmente, otros autores han demostrado un importante efecto frente a larvas de *H. contortus* de plantas como *Curcubia moschata*, capaz de paralizar a las L3 hasta en un 90 % (**Marie-Magdeleine et al., 2009**) o *Spigelia athelmia* Linn, con actividad larvicida del 80 % (**Assis et al., 2003**). Por último, en un estudio reciente donde se utilizó el ensayo de migración larvaria para evaluar el efecto del aceite esencial de *Artemisia lacea* frente a las L3 de *H. contortus*, se observó una actividad antihelmíntica significativa, con disminuciones de la movilidad larvaria de hasta el 77 % (**Zhu et al., 2013**).

En base a la mayor actividad antihelmíntica frente a *H. contortus* encontrada en el extracto metanólico elaborado a partir de *R. pinnata* en el primer *screening* realizado con las tres plantas, se diseñó un estudio más profundo para analizar las propiedades antiparasitarias de este endemismo canario. Para ello, se realizaron diferentes ensayos *in vitro* con distintas partes de la planta, concretamente con frutos, tanto maduros como verdes, utilizando, además, distintos disolventes para la elaboración de extractos. En dichos ensayos se empleó el test de movilidad larvaria para la evaluación de la actividad larvicida frente a las L3 de *H. contortus*.

A partir de los frutos maduros de *R. pinnata* se elaboraron un extracto acuoso y uno metanólico, a partir de los cuales se realizó una segunda extracción con diferentes disolventes, obteniéndose de esta forma un total de cuatro fracciones. Mediante el mismo procedimiento se elaboraron los extractos de frutos verdes, aunque no se utilizó el extracto metanólico crudo en los ensayos por falta de disponibilidad. De todos los extractos ensayados, destacó la actividad larvicida del extracto metanólico de frutos maduros, observándose que fue capaz de inhibir la movilidad larvaria significativamente, incluso a una concentración de 0,015 mg/ml. Este resultado fue similar al obtenido con el extracto acuoso, que también mostró diferencias significativas con el control negativo a la menor concentración utilizada (0,0125 mg/ml). A diferencia de estos, la actividad larvicida mostrada por el extracto acuoso elaborado a partir de frutos verdes fue mucho menor, no superando nunca el porcentaje de parálisis larvaria el 40 % en ninguna de las concentraciones utilizadas. Los resultados muestran, claramente, que el estado de maduración de los frutos de *R.*

*pinnata* influye en la actividad antihelmíntica de los extractos siendo, en este caso, mayor la actividad en aquellos que fueron elaborados con frutos maduros. Estas diferencias también se observaron al comparar un mismo extracto, pero procedentes de distintas partes de la planta. Así, el extracto metanólico de frutos maduros de *R. pinnata* presentó mayor actividad larvicida que el mismo extracto de planta entera a iguales concentraciones. Por tanto, el fruto maduro de *R. pinnata* presentaría mayor actividad larvicida, no sólo en comparación con los frutos verdes, sino también con respecto a la planta entera en sí. Esta diferencia se puede apreciar más claramente al comparar los datos de DL50, que fue de 0,1 mg/ml para extracto metanólico de frutos maduros y tres veces superior (0,3 mg/ml) para el extracto metanólico de planta entera. Las diferencias de actividad entre las distintas partes de una misma planta frente a larvas de *H. contortus* se ha observado también en otras especies vegetales, como *Maesa lanceolata*. Esta planta, usada tradicionalmente en diferentes países africanos como vermífugo, tenicida y ascaricida, ha demostrado tener una potente actividad larvicida *in vitro*, especialmente cuando se emplean extractos elaborados a partir de sus frutos, siendo la actividad mucho menor cuando se utilizan hojas en la fabricación de los extractos (Tadesse *et al.*, 2009). Por el contrario, en el caso de *Melia azedarach*, los extractos de hojas presentaron mayores porcentajes de actividad larvicida que las semillas, mostrando una DL50 igual a 9,18 mg/ml (Maciel *et al.*, 2006).

En los estudios realizados por Maciel *et al.* (2006) y Tadesse *et al.* (2009) no sólo se evaluaron las diferencias de actividad de las distintas partes de una misma planta, sino que también se valoró la influencia del tipo de disolvente empleado en la elaboración de los extractos. Los resultados de ambos estudios mostraron que el extracto hydro-alcohólico de *M. lanceolata* y el extracto etanólico de *M. azedarach* presentan mayor actividad antihelmíntica que los extractos acuosos y hexánicos de las mismas. Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente trabajo, donde también se observaron diferencias entre extractos elaborados a partir de diferentes disolventes. Así, las diferentes fracciones utilizadas en los ensayos de parálisis larvaria, las obtenidas a partir de frutos maduros (fracciones hexánica, acetato de etilo, cloroformo y acuosa), las cuales, por otro lado, mostraron mayor actividad larvicida que las elaboradas a partir de frutos verdes (fracciones hexánica, acetato de etilo y acuosa), en todos los casos indujeron porcentajes de parálisis larvaria mucho menores que los mostrados por el extracto metanólico de frutos maduros de *R. pinnata*. Estas diferencias podrían ser debidas a que la extracción cruda con metanol permite el aislamiento de una más amplia gama de productos activos, en teoría responsables de la actividad antihelmíntica; tal vez por este motivo sea el método de extracción más utilizado en los primeros estudios encaminados a evaluar las propiedades farmacológicas de una planta. Como ejemplo, de la extracción metanólica inicial llevada a cabo para la preparación de extractos de *Musa paradisiaca* se obtuvieron productos a los que se les atribuyó una alta actividad antihelmíntica. Tras un posterior análisis e identificación de sus componentes, se observó que el extracto metanólico original incluía taninos, saponoides, terpenoides y flavonoides, todos ellos metabolitos con gran interés en la medicina natural (Marie-Magdeleine *et al.*, 2014). Además, el empleo de un variado número de disolventes permite el aislamiento de un mayor número de principios activos, siendo, en general, los extractos que se fabrican

utilizando disolventes orgánicos mucho más activos que los acuosos, con lo que cabría pensar que los compuestos responsables de la actividad antihelmíntica no son hidrosolubles. Coincidiendo con lo encontrado al analizar las distintas fracciones de *R. pinnata* en el presente trabajo, los extractos hexánico, de acetato de etilo y etanólico de *Jatropha curcas* presentaron más actividad larvicida que el extracto acuoso de dicha planta (Monteiro *et al.*, 2011). Sin embargo, esto no ha de considerarse una regla absoluta, pues en ocasiones son los extractos acuosos los que poseen mayor actividad, tal y como se deriva de los resultados obtenidos por Tadesse *et al.* (2009) y Ademola *et al.* (2011) utilizando diferentes plantas.

Los resultados de los ensayos de movilidad larvaria realizados con extractos fabricados a partir de diferentes partes de la planta de *R. pinnata* y empleando distintos disolventes demostraron que el extracto crudo metanólico de frutos maduros era el que presentaba mayor actividad frente a las L3 del *H. contortus*. Por este motivo, se decidió comprobar si este extracto presentaba, además, actividad ovicida, adulticida y efecto sobre el desarrollo larvario, para lo cual se emplearon los mismos ensayos que al evaluar la actividad antihelmíntica de *R. pinnata*, *R. graveolens* y *P. bituminosa*: ensayo de eclosión de huevos, de viabilidad de adultos y de desarrollo larvario, respectivamente. El extracto metanólico de frutos maduros de *R. pinnata* no sólo mostró una actividad ovicida elevada, disminuyendo la eclosión de los huevos en valores superiores al 50 %, sino que también detuvo el desarrollo larvario en todas las concentraciones utilizadas en el ensayo, afectando así a las L1 y L2 del parásito y deteniendo, por tanto, su desarrollo hasta L3 infectantes. Estos resultados muestran que dicho extracto presenta, en general, mayor actividad antihelmíntica que el homólogo de planta entera, observándose diferencias, no sólo en la actividad larvicida sino también en la ovicida. De igual forma, la actividad del extracto metanólico de fruto maduro de *R. pinnata* fue más elevada que la presentada por los extractos metanólicos de *R. graveolens* y *P. bituminosa*. Del mismo modo, los porcentajes de mortalidad de adultos obtenidos en el ensayo con el extracto metanólico de frutos maduros de *R. pinnata* fueron mayores que los mostrados por los extractos de planta entera, incluida *R. pinnata*. Como se discutió anteriormente, es común encontrar distintos niveles de actividad antihelmíntica entre diferentes partes de una planta, hecho que ha sido descrito por varios autores, como Maciel *et al.* (2006) o Tadesse *et al.* (2009); sin embargo, no es frecuente encontrar un mismo extracto que muestre una actividad antihelmíntica estadísticamente significativa frente a todos los estados de *H. contortus*. Es importante remarcar que el fruto maduro de *R. pinnata*, no sólo presenta más actividad que otras partes de la planta, sino que, además, dicha actividad está dirigida frente a distintas fases del desarrollo parasitario de *H. contortus*. No ocurre así con otros extractos elaborados con frutos, como los pertenecientes a *Melia azedarach*, cuya actividad larvicida inhibiendo el desarrollo larvario se ha demostrado muy manifiesta, pero no así su efecto ovicida (Cala *et al.*, 2012).

Los resultados obtenidos en los ensayos realizados con los diferentes extractos de *R. pinnata* sugieren que a partir de este endemismo canario, se podrían obtener extractos con alta actividad antihelmíntica que podría constituir una alternativa al tratamiento y control de infecciones con *H. contortus* en pequeños rumiantes. No

obstante, como se ha indicado, *R. pinnata* es una especie endémica protegida de las Islas Canarias y, además, la disponibilidad de material vegetal de la planta es baja. Por este motivo, se planteó la posibilidad de elaborar compuestos a partir de cultivos *in vitro* de material vegetal de la planta y evaluar su actividad. De la misma manera, **Razak et al., (2014)** señalaron que el cultivo *in vitro* de material vegetal de plantas con estas características, como *Stevia robaudiana*, era una posible alternativa para la obtención en grandes cantidades de plantas utilizadas comúnmente en la medicina tradicional.

Para la elaboración de los compuestos *in vitro* utilizados en el presente trabajo, se cultivó material vegetal procedente de *R. pinnata* en distintos tipos de medio Murashige-Skoog (MS): MSe, MS6 o MS3. Este medio ha sido utilizado en otros trabajos para el cultivo *in vitro* de diferentes plantas, como *Artemisia aucheri*, cuyos derivados se consideran potentes agentes frente a la malaria y una gran variedad de tumores cancerígenos (**Sharafi et al., 2014**). Los autores consiguieron altos porcentajes de crecimiento de la planta, por lo que propusieron este método de cultivo como simple, fiable, rápido y con alta eficiencia de regeneración. Un mismo método de regeneración también se ha empleado con *Curcuma longa* (**Sunitibala et al., 2001**), una planta que ha demostrado tener una alta actividad antihelmíntica frente a nematodos que afectan al ganado caprino y ovino (**Lans et al., 1998**).

En primer lugar se evaluó la actividad larvicida y adulticida de extractos metanólicos elaborados a partir de 3 compuestos obtenidos de 3 medios de cultivos *in vitro* distintos: CM-134, CM-135 y CM-463.1. Los dos primeros mostraron un importante efecto larvicida mediante el ensayo de parálisis larvaria, aunque la actividad sobre las L3 fue menor que la mostrada por el extracto metanólico de planta entera y frutos maduros de *R. pinnata*. Comparando las DL50 de cada uno de ellos, se puede apreciar que el valor de DL50 para el extracto metanólico de frutos maduros de *R. pinnata* es hasta dos veces menor que el calculado para los compuestos *in vitro* CM-134 y CM-135 (0,33, 0,40 y 0,60 mg/ml, respectivamente).

A partir de los valores obtenidos en los ensayos de movilidad larvaria, se realizaron ensayos de viabilidad de adultos con los compuestos CM-134 y CM-135, obteniéndose valores prácticamente iguales a los extractos naturales. Estos resultados sugieren que el medio utilizado para el cultivo de los compuestos CM-134 y CM-135 hace posible la obtención de un producto con similares características al natural en el que mantendrían activos aquellos compuestos que presentan actividad antihelmíntica y que son extraídos con la extracción cruda con metanol. Coincidiendo con lo observado en el presente trabajo, los resultados realizados con cultivos *in vitro* de *Pastinaca sativa*, una planta que presenta de forma natural compuestos con propiedades curativas, como las cumarinas, demostraron que los productos obtenidos *in vitro* presentaban las mismas características que los compuestos producidos de forma natural, pero en menor medida (**Ekier et al., 2000**). De la misma forma, cultivos *in vitro* en medio MS de *Achemilla mollis*, planta medicinal utilizada tradicionalmente para enfermedades ginecológicas, se ha demostrado que generan productos que mantienen los mismos componentes y misma actividad antioxidante que la planta,

pero, al igual que en el anterior trabajo, su actividad era menor (**Stanilova et al., 2012**).

Una vez comprobada la actividad antihelmíntica de los compuestos metanólicos obtenidos *in vitro*, se evaluó la actividad de distintas fracciones (hexánica, cloroformo, acetato de etilo y acuosa) elaboradas a partir del compuesto CM-463.1 (extracto metanólico cultivado en medio MS6). En general, todas las fracciones de origen *in vitro* evaluadas presentaron una actividad larvicida moderada, siendo alrededor del 60 % en la mayor concentración utilizada (3 mg/ml) y siguiendo una dosis dependiente en las siguientes concentraciones. Sin embargo, como en los análisis de los compuesto *in vitro* discutidos anteriormente, los porcentajes de parálisis larvaria fueron menores que los encontrados en los extractos de origen natural. Es importante reseñar que las fracciones hexánica, de cloroformo, de acetato de etilo y acuosa presentaron un grado variable de actividad antihelmíntica que, en ningún caso, pudo demostrarse en el compuesto original CM-463.1. Como se comentó en párrafos anteriores, la extracción con metanol permite aislar la mayor parte de los compuestos presentes en el material vegetal de diverso origen, natural o *in vitro*, por lo que podría considerarse la posibilidad de que con la extracción con metanol se extrajeran determinados componentes que, al presentarse conjuntamente en el extracto, interfiriesen en su actividad y que, al realizar una segunda extracción con disolventes de diferentes polaridades, estos compuestos se aislaran pudiendo ejercer su actividad antiparasitaria. Menos probable sería que solventes de polaridad tan dispar como el hexano, el cloroformo, el acetato de etilo y el agua pudieran todos ellos extraer compuestos activos que no lograron aislarse mediante la extracción metanólica.

### 6.1.2. ACTIVIDAD ANTICOCIDIÓSICA

Una alternativa al tratamiento con quimioterápicos frente a los coccidios podría ser la aplicación en el ambiente de desinfectantes con el objetivo de inhibir la esporogonia asexual exógena del parásito (**Williams, 1997**), la cual es esencial para que los ooquistes alcancen el estado infectante. Los ooquistes frescos de *Eimeria* eliminados por los animales infectados son siempre no esporulados y contienen en su interior únicamente el esporoblasto, el cual sufre una reproducción asexual exógena o esporogonia en presencia de oxígeno y a una temperatura adecuada, después de la cual los ooquistes pasan a ser infectantes, proceso que no suele ocurrir antes de 48 horas. Sólo los ooquistes totalmente esporulados, que deben contener 4 esporocistos con 2 esporozoítos cada uno, podrán propagar la infección una vez sean ingeridos por un nuevo hospedador (**Mundt et al., 2003, Dauschies y Najdrowski, 2005**). En este aspecto, se ha demostrado que diferentes desinfectantes poseen actividad frente a los ooquistes no esporulados de *Eimeria tenella*, no sólo inhibiendo la esporulación si no también destruyéndolos, con actividades próximas al 80 % (**Guimarães et al., 2007**) o, incluso, al 100 %, como se observó para el ácido acético (**You et al., 2014**).

Los datos de los diferentes ensayos de inhibición de la esporulación de ooquistes demuestran que los extractos utilizados presentan una actividad anticoccidiósica muy variable. Los extractos metanólicos de las partes aéreas de *Ruta*

*pinnata*, *Ruta graveolens* y *Psoralea bituminosa* mostraron una moderada actividad anticoccidiósica con porcentajes de esporulación de ooquistes mayores al 60 % después de 24 horas de incubación. Los resultados obtenidos con el extracto metanólico elaborado a partir de frutos de *Ruta graveolens* fueron similares a los mostrados por el mismo extracto perteneciente a la planta entera, no superando en este caso el 50 % de efecto sobre la esporulación de los ooquistes en ninguna de las concentraciones utilizadas en el ensayo. Aunque la actividad mostrada por estos extractos no fue muy marcada, sí que superó a la encontrada por otros autores como **Saratsis et al., (2012)**, quienes sólo pudieron demostrar un leve efecto de los extractos de *Onobrychis viciifolia* sobre la esporogonia en diferentes especies de *Eimeria* del ganado ovino. En concreto, en este estudio el mayor porcentaje de inhibición de la esporulación fue del 10,7 % a una concentración de 1200 µg/ml.

Si bien el extracto metanólico de planta de *Ruta pinnata* no presentó una marcada actividad anticoccidiósica, el mismo extracto procedente de sus frutos maduros disminuyó la esporulación de los ooquistes hasta en un 80 % a una concentración de 3 mg/ml después de 24 horas de incubación, siendo este resultado similar al obtenido con el control positivo (10 % formaldehído). De acuerdo con esto, la dosis inhibitoria 50 (DL50) fue unas diez veces menor en el extracto de fruto maduro que en el obtenido a partir de la planta. Vuelven a repetirse, por tanto, las diferencias de actividad, en este caso anticoccidiósica, según la parte de la planta analizada, tal y como se describió anteriormente en el análisis de actividad antihelmíntica de *R. pinnata* y en otros estudios (**Tadesse et al., 2009**).

La actividad mostrada por el extracto metanólico de frutos maduros de *Ruta pinnata* es comparable a la mostrada por los extractos elaborados a partir de la corteza de pino. Este extracto fue utilizado en un estudio realizado por **Molan et al. (2009)** en tres especies de *Eimeria* en aves en el que pudo constatarse una inhibición de la esporulación de un 42,6 %, 24,5 % y 10,9 % a concentraciones de 250, 500 y 1000 µg/ml, respectivamente.

Cuando el periodo de incubación de los ooquistes con el extracto metanólico de frutos maduros fue menor de 24 horas, en concreto de 30 minutos y 4 horas, la actividad anticoccidiósica no fue tan manifiesta, observándose únicamente diferencias con el control negativo ( $P < 0,001$  y  $P < 0,01$ ) en las concentraciones mayores. Varios autores han descrito que la eficiencia de los desinfectantes está condicionada, no sólo por la concentración de los mismos, sino también por tiempo de exposición, es decir, el tiempo que el producto está en contacto con el ooquiste. Así, al analizar el efecto de la concentración y el tiempo en la eficacia de diversos desinfectantes químicos comerciales, como el hidróxido de amonio, el fenol, el Zixvirox y el Eco bio, sobre la esporulación de ooquistes de *Eimeria tenella* se demostró que el hidróxido de amonio 5 % y 10 % y el Fenol 10 % fueron los que presentaron mayor eficacia frente a los ooquistes no esporulados de *Eimeria tenella*, y, como se comentó anteriormente, dicha actividad aumentaba a medida que lo hacía el tiempo de exposición del producto (**Samaha et al., 2013**).

A la hora de relacionar la actividad del extracto y el tiempo de exposición hay que considerar que este tiempo sea útil y práctico a la hora de utilizarlo. **Senger**

(1959), en un estudio con ooquistes de *Eimeria bovis*, evaluó la actividad de varios compuestos obteniendo resultados de inhibición de la esporulación hasta del 80 %. Sin embargo, este resultado se obtuvo después de 48 horas de exposición, por lo que podría descartarse el uso de dicho extracto en la realidad de la producción ganadera, no sólo por la duración que tendría el tratamiento sino además por la posible corrosividad y/o toxicidad del producto o, en caso de los extractos naturales, porque, debido a su origen, algunos de ellos puedan llegar a ser volátiles y/o perder su actividad a lo largo del tiempo.

También se utilizó en los ensayos *in vitro* de esporulación de ooquistes el extracto acuoso de frutos maduros de *Ruta pinnata*. Este extracto no mostró una actividad anticoccidiósica tan elevada como el metanólico del mismo origen, y, aunque se observaron diferencias significativas ( $P < 0,001$  y  $P < 0,01$ ) con el control negativo, la dosis necesaria para detener la esporulación de 50 % de los ooquistes fue mucho mayor a la del extracto metanólico (164,7 mg/ml). Estos resultados fueron similares a los obtenidos en el presente trabajo con los mismos extractos cuando se evaluó la actividad antihelmíntica, tal y como se discutió en el apartado anterior. Sin embargo, no siempre los extractos metanólicos presentan mayor actividad antiparasitaria que los acuosos. Por ejemplo, **Iqbal et al. (2005)**, al evaluar la actividad antihelmíntica de *Calotropis procera* demostraron que los extractos metanólicos presentaban menor actividad que los acuosos.

Los compuestos producidos a partir de cultivos *in vitro* de material vegetal de *Ruta pinnata* no redujeron la esporulación de los ooquistes de *Eimeria ninakohlyakimovae* en porcentajes superiores al 35 % en todas las concentraciones utilizadas tras 24 horas de incubación; siendo la actividad anticoccidiósica de estos menor a la mostrada por los extractos naturales procedentes de la misma planta, tal y como se comentó en el apartado de la discusión sobre la actividad antihelmíntica de compuestos *in vitro*. Estos resultados no variaron en función del tipo de medio de cultivo utilizado para el crecimiento del material vegetal ni en función del disolvente empleado para la extracción. En base a los resultados del presente estudio, no resulta posible determinar por qué los extractos obtenidos de material vegetal *in vitro* presentan actividad frente a nematodos pero no frente a coccidios, a pesar de que se emplearon los mismos medios de cultivo y similares métodos de extracción. Además, los extractos naturales, en mayor o menor medida, presentaron actividad frente a ambos grupos parasitarios. Una posible explicación sería que los medios de cultivo y/o la metodología utilizada no serían los adecuados para obtener un producto con actividad anticoccidiósica. En este sentido, los cultivos *in vitro* podrían funcionar como un medio de purificación de compuestos que, en el presente estudio, habría derivado en la selección de aquellos que poseen actividad frente a nematodos y no frente a coccidios. De hecho, los compuestos activos frente a nematodos no necesariamente lo son para coccidios.

El compuesto *in vitro* CM-475.3 fue estudiado en varios periodos de incubación, 30 minutos, 4 horas y 24 horas, y al contrario que el extracto metanólico de frutos maduros de *R. pinnata*, este producto no mostró mayor efecto a medida que aumentaba el tiempo. Aunque la DL50 disminuyó hasta 8,03 mg/ml desde los 30

minutos hasta las 24 horas, los resultados obtenidos no fueron significativos con respecto al control negativo en ninguna de las concentraciones y periodos de tiempo utilizados, lo que contrasta con la actividad anticoccidiósica antes señalada para el extracto natural. Como ya se ha comentado, tiempos superiores a 24 h de exposición serían poco prácticos en condiciones reales en ganadería (**Senger, 1959**) por lo que el compuesto CM-475.3 no podría considerarse como un buen candidato como antiséptico frente a los ooquistes de *E. ninakohlyakimovae*.

Los ooquistes son considerados el elemento de resistencia de los coccidios y, de hecho, son capaces de tolerar gran variedad de adversidades tanto físicas como las provocadas por agentes químicos. **McDonnel y Russel (1999)** han clasificado a los ooquistes como el elemento etiológico más resistente a los desinfectantes, después de los priones. Por esta razón, son necesarias concentraciones moderadas y altas de químicos abrasivos para inhibir su esporulación. La capacidad de los extractos de inhibir el ciclo exógeno del parásito podría ser una alternativa bio-orgánica para la desinfección temprana de construcciones y material, especialmente bajo condiciones de explotación intensiva de rumiantes, como ya fue sugerido para la producción de pollos por **Williams (1997)**. Por todo ello, no se debería infravalorar el efecto anticoccidiósico encontrado en el presente estudio en los extractos naturales de plantas analizados, pero también en los obtenidos a partir de material vegetal cultivado *in vitro*.

En base al conjunto de resultados obtenidos en el presente trabajo al valorar la actividad anticoccidiósica, la relevancia científica de las propiedades anticoccidiósicas de los extractos radica, no sólo en su uso como desinfectantes sino, además, como alternativa a los anticoccidiósicos y coccidiostáticos convencionales, ya que muchos de ellos presentaron un efecto importante sobre el primer estado infectante de parásito, los esporozoítos.

Tanto el ensayo de viabilidad de esporozoítos como el de inhibición de la invasión celular con el extracto metanólico de frutos maduros de *R. pinnata* sirvieron para demostrar que este extracto no sólo afecta a la viabilidad de los esporozoítos sino también a su capacidad para invadir las células hospedadoras, en la que se desarrollarían posteriormente los esquizontes de primera generación. En *Eimeria ninakohlyakimovae*, dichos esquizontes pueden llegar a tener un tamaño superior a 300 µm y tras su rotura originan una gran destrucción de la mucosa del intestino delgado de los animales infectados (**Dai et al., 2006, Ruiz et al., 2013**). Otros autores también han descrito un efecto inhibitorio de extractos naturales frente a esporozoítos de coccidios de aves. Así, se ha observado que el carvacol, la curcumina o los extractos de *Echinacea purpurea* inhiben la invasión de las células denominadas Madin-Darby bovine Kidney (MDKB) por los esporozoítos de *Eimeria tenella* después de 24 horas de incubación (**Burt et al., 2013**). Los resultados del presente trabajo también son comparables a los publicados por **Khalafalla et al. (2011)**, quienes, después de 3, 8, 18 y 24 horas de incubación, demostraron que la curcumina afectaba a la morfología y a la viabilidad de los esporozoítos, así como su capacidad de invasión. Estudios en otros coccidios, como *Toxoplasma gondii*, muestran que *Artemisia annua* inhibe en porcentajes superiores al 75 % la invasión celular *in vitro* por los taquizoítos de dicho parásito (**Carrijo de Oliveira et al., 2009**).

La molécula o moléculas responsables de la actividad sobre los diferentes estadios del coccidio de pequeños rumiantes *E. ninakohlyakimovae* es aún desconocida. Por otro lado, el mecanismo de acción de los compuestos que se encuentran en los extractos utilizados en el estudio no tiene por qué ser igual en todos los casos, pudiendo variar de si actúan inhibiendo la esporulación, comprometiendo la viabilidad de los esporozoítos o inhibiendo su capacidad para invadir células.

Además, al comparar los resultados obtenidos en los diferentes tipos de ensayos realizados con el extracto metanólico de frutos maduros de *Ruta pinnata* (ensayo de inhibición de la esporulación, ensayo de viabilidad de esporozoítos y ensayo de inhibición de la invasión celular), se puede observar que, a igual concentración, los niveles de actividad anticoccidiósica no son los mismos, según demuestran las DL50 de cada ensayo. De esta forma, 0,839 mg/ml fue la dosis necesaria para inhibir en un 50 % la esporulación de los ooquistes, 0,4884 mg/ml la dosis eficaz para obtener un 50 % de mortalidad de esporozoítos y  $1,15 \times 10^{-6}$  mg/ml DL50 para inhibir su capacidad de invasión celular. Estos datos corroboran que los esporozoítos libres son más susceptibles que los ooquistes al extracto a la misma concentración y con un periodo de incubación mucho menor, 3 horas y no 24, como en el caso de los ooquistes. La explicación más probable a este fenómeno podría ser la protección que confiere la pared del ooquiste frente a las condiciones adversas del medio. De hecho, gracias a su pared quística los ooquistes de *E. bovis* pueden resistir hasta 4 años y medio en un ambiente húmedo a 4 °C (**Hermosilla et al., comunicación personal**). Esta puede ser la explicación a los resultados observados con los extractos de *Onobrychis viciifolia*, los cuales no inhibieron la esporulación de los ooquistes en los ensayos *in vitro* pero si mostraron actividad anticoccidiósica *in vivo* al usar la planta como forraje en ovejas infectadas naturalmente por varias especies de *Eimeria* spp. (**Saratsis et al., 2012**).

## 6.2. ENSAYOS *IN VIVO*

La nematodosis causada por *H. contortus* y la coccidiosis se citan entre las parasitosis más frecuentes que afectan a los pequeños rumiantes, siendo, además, de las más graves, debido a su patogenicidad. La acción patógena de los parásitos se traduce en cuantiosas pérdidas en la producción debido a la sintomatología y a la clínica que presentan los animales infectados, a lo cual habría que sumar el coste de los antihelmínticos y anticoccidiósicos usados comúnmente en la ganadería. Todo ello, junto con la creciente aparición de resistencias a estos productos, ha estimulado la búsqueda alternativas como la fitoterapia, siempre en combinación con adecuadas medidas de manejo. Por esta razón, aparte de mediante ensayos *in vitro*, la actividad de determinados extractos frente a *H. contortus* y *E. ninakohlyakimovae* también se evaluó mediante un ensayo *in vivo*. Con ello se pretendía comprobar si el efecto observado *in vitro* se mantenía en el organismo vivo.

Se decidió utilizar un extracto metanólico de frutos de *R. pinnata* (CM-481), ya que dicho extracto fue el que mayor actividad antiparasitaria mostró en los ensayos *in vitro*. También se empleó un extracto metanólico elaborado a partir de un cultivo *in*

*vitro* de material vegetal de esta misma planta (CM-472), obtenido siguiendo un procedimiento de elaboración similar a los otros compuestos de origen *in vitro* utilizados en el estudio, cuya actividad larvicida se discutió anteriormente. En este ensayo se evaluó el estado corporal de los animales, la presencia y características de la diarrea, así como existencia de anemia mediante la observación de las mucosas. Además, se realizaron recuentos de huevos y ooquistes en heces antes y después de tratamiento para, indirectamente, determinar si existía una disminución o no de la carga parasitaria.

Todos los animales que fueron inoculados mostraron una clínica grave, siendo signos comunes la presencia de mucosas pálidas, cuadros diarreicos hemorrágicos, acompañado en ocasiones de restos de mucosa intestinal, decaimiento, anorexia, postración, caquexia e incluso muerte de algunos de los animales. Estos signos remitieron en los animales pertenecientes al grupo C después del tratamiento con los antiparasitarios comerciales (ivermectina y diclazuril). La clínica de los animales del grupo A y B (grupos tratados con los extractos CM-481 y CM-472, respectivamente) también mejoró tras el tratamiento, aunque la recuperación de los animales no fue tan rápida como la de aquellos que fueron tratados con ivermectina y diclazuril. En concordancia con estos resultados, diversos autores han demostrado que la alimentación del ganado caprino con pellets de *Sericea lespedeza* disminuye la pérdida de peso de animales infectados por nematodos gastrointestinales, a la vez que reduce la aparición de palidez de las mucosas, lo que sugiere que dicha planta tiene efecto sobre los adultos de *H. contortus*. Este hecho se demostró tras el sacrificio de los animales, ya que aquellos que habían sido tratados con el extracto presentaban un menor número de vermes en el abomaso que los que no habían recibido los pellets en la dieta (Terril *et al.*, 2007). También en concordancia con los resultados del presente trabajo, se ha observado que el tratamiento con extractos elaborados con *Elephantorrhiza elephantina* en cabras parasitadas por *H. contortus* contribuyó a una notable disminución de los síntomas de la enfermedad, y a mantener una buena condición corporal durante toda la experiencia en los animales tratados (Maphosa *et al.*, 2012). Los animales utilizados en el experimento *in vivo* de este estudio que fueron tratados con los extractos CM-481 y CM-472 no presentaron una mejoría de los síntomas tan notoria como la descrita por estos otros autores. Esto no tiene por qué significar que el efecto antiparasitario fuese leve o inexistente, ya que los animales de esta experiencia fueron inoculados con dos parásitos diferentes, *H. contortus* y *E. ninakohlyakimovae*, y por tanto los síntomas pudieron verse agravados por esta razón. Además, en los ensayos de Terril *et al.* (2007) y Maphosa *et al.* (2012), las infecciones fueron naturales, a priori, una situación no tan extrema como la evaluada en este trabajo.

Para determinar si los tratamientos con los extractos CM-481 y CM-472 presentaban efecto *in vivo* sobre *H. contortus* se realizaron recuentos fecales de los animales pertenecientes a los diferentes grupos del ensayo. Los recuentos de los animales de los grupos A y B (tratados con los extractos CM-481 y CM-472, respectivamente) siguieron una tendencia similar. El número de huevos aumentó hasta el día del tratamiento y comenzó a disminuir después del mismo, manteniéndose

los recuentos en valores cercanos a 2000 HPG a partir de entonces. La reducción de los recuentos fecales de huevos fue más clara si se compararon los recuentos acumulados de los días antes y después del tratamiento. En tal circunstancia, los valores de HPG del grupo A mostraron diferencias significativas ( $P < 0,01$ ) antes y después del tratamiento, siendo estas diferencias no tan manifiestas en el grupo de animales tratado con el extracto *in vitro*. Resultados similares a los descritos en este trabajo se han observado en otros estudios, como el realizado con el extracto acuoso de *Ananas comosus*, el cual presenta una alta actividad antihelmíntica *in vitro* frente a huevos y larvas, pero en los ensayos *in vivo* la actividad de dicho extracto no fue significativa (Ferreira et al., 2013). Sin embargo, *Elephantorrhiza elephantina* produjo una reducción en el recuento de huevos en cabras infectadas por nematodos gastrointestinales del 98 % en el día 56 postinfección afectando principalmente a los adultos de *H. contortus*, como se ha comentado anteriormente (Maphosa et al., 2012). Este mismo autor describió en 2011 el efecto *in vivo* sobre nematodos gastrointestinales y coccidios en cabras de tres plantas usadas comúnmente en la medicina tradicional de Sudáfrica, *Aloe ferox*, *Elephantorrhiza elephantina* y *Leonis leonours*, las cuales redujeron hasta el 60% los recuentos de huevos y ooquistes de los animales tratados (Maphosa et al., 2011).

Al evaluar la posible actividad anticoccidiósica de los extractos mediante la determinación de los recuentos fecales de ooquistes, al existir una infección natural por coccidiosis en los animales de la granja donde se realizó la experiencia, fue necesario tener en cuenta el número de ooquistes que presentaban los animales al comienzo del estudio, valor que fue de aproximadamente 4500 ooquistes por gramo de heces (OPG) durante todo el ensayo, tal y como se observó en los animales que formaban el grupo E (animales no inoculados ni tratados). Los demás grupos se inocularon con 200.000 ooquistes esporulados de *E. ninakohlyakimovae* por lo que, en todos ellos, se observó un pico de eliminación de ooquistes en torno a los días 16-17 postinfección. Después de este pico, los valores de OPG variaron en función de los grupos y tratamientos administrados. Así, en el grupo D (animales inoculados y no tratados), tras el pico de eliminación de ooquistes los recuentos disminuyeron progresivamente hasta 5000 OPG, recuentos similares a los mostrados por el grupo E. Esta tendencia fue similar en los grupos tratados con los extractos, tanto el natural como el de origen *in vitro*. Sin embargo, en los animales que fueron tratados con diclazuril el número de ooquistes en heces disminuyó hasta 0 en el día 5 después del tratamiento. En base a estos resultados, los extractos utilizados en la experiencia *in vivo* no mostraron un efecto marcado frente a los coccidios, ya que no se consiguió que los animales tratados con estos compuestos dejaran de eliminar ooquistes en las heces. No obstante, se ha demostrado que algunas plantas sí presentan actividad anticoccidiósica. Por ejemplo, el suplemento de la dieta con *Sericea lespedeza* en ovejas infectadas naturalmente con diferentes especies de *Eimeria* produjo una reducción significativa en el recuento de ooquistes en heces (Maphosa et al., 2012, Burke et al., 2013). Otras plantas como *Melia azedarach* y *Psitacia lentiscus* también redujeron el número de ooquistes en heces de rumiantes infectados por coccidios (Madibela et al., 2008; Markovics et al., 2012). También en aves, diferentes plantas han demostrado ser eficaces *in vivo* frente a la coccidiosis. Así, la administración de extractos elaborados a partir de *Eclipta alba*, *Musa paradisiaca* y *Argeratum*

*conyzoides* en la dieta de pollos inoculados con *E. tenella* han sido capaces de reducir el número de ooquistes por gramos de heces, así como el deterioro físico de los animales y las lesiones microscópicas típicas de la infección por coccidiosis (**Nweze et al., 2009; Anosa et al., 2011; Michels et al., 2011**).

En general, los extractos CM-481 y CM-472 mostraron cierta actividad antihelmíntica pero no frente a coccidios *in vivo*, a pesar de que ambos presentan un efecto elevado frente a *H. contortus* y *E. ninakohlyakimovae in vitro*. Este hecho puede estar relacionado con la farmacocinética y farmacodinámica de dichos compuestos en la cabra, cuya naturaleza se desconoce, así como al tiempo de absorción y de duración en el organismo. Además, puede ser que la administración oral del tratamiento no sea la más idónea e incluso que la dosis utilizada en el ensayo no sea la adecuada. En el estudio realizado por **Maphosa et al. (2012)**, tampoco se observó una disminución marcada en los recuento de huevos de los animales muestreados hasta el día 56 después de tratamiento. Por el contrario, en otros ensayos realizados con plantas se ha demostrado una notable actividad frente a la coccidiosis caprina, entre los que se incluyen los realizados con *Melia azedarach* y *Pistacia lentiscus*; en dichos estudios se administraron los extractos por largos periodos de tiempo, 3 semanas y un mes, respectivamente, observándose únicamente disminución de los recuentos de ooquistes después de dos semanas de tratamiento (**Madibela et al., 2008; Markovics et al., 2012**), siendo en este caso necesaria la administración de varias dosis para obtener un efecto significativo. En el presente trabajo se utilizó una única dosis y se realizaron recuentos hasta una semana después del tratamiento, por lo que, según lo expuesto en los trabajos anteriores, cabría pensar que la actividad anticoccidiósica de los extractos podría haber sido mayor si se hubiese incrementado la dosis de extracto o si se hubieran realizado más de una administración. Otro aspecto a tener en cuenta a la hora de evaluar la actividad antiparasitaria de los compuestos, es el complejo sistema digestivo que presentan los rumiantes. Hay autores que han señalado la importancia del paso de los extractos naturales por el rumen, sugiriendo que en este órgano puede destruirse los compuestos activos de la planta debido a la acción de la flora ruminal o bien por el efecto del pH del rumen. Además, la digestión en el rumen podría provocar una disolución de los extractos por lo que llegarían con menor disponibilidad o actividad al abomaso (**Pervez et al., 1994**).

En este tipo de estudios *in vivo*, ha de tenerse en cuenta no sólo la posible actividad antiparasitaria del extracto sino además su posible toxicidad. Con tal fin se evaluó la citotoxicidad del extracto metanólico de frutos maduros de *R. pinnata* en cultivos celulares *in vitro* en BCEC y células VERO. En ambos caso no se observó muerte celular, o fue leve a las concentraciones más elevadas de extracto, en comparación con los correspondientes controles negativos. Del mismo modo, ensayos de citotoxicidad realizados con carvacol, compuesto que se encuentra en varias plantas como el orégano, mostraron que dicho compuesto no interfería en el crecimiento celular de células MDBK (Madin-Darby bovine kidney) por lo que se consideró que no presentaba toxicidad a las concentraciones utilizadas en el estudio (**Burt et al., 2013**).

Ante la posibilidad de que los extractos utilizados pudieran causar daños en el organismo de los animales, además de los resultados de los ensayos de citotoxicidad *in*

*vitro*, previamente a la realización del experimento *in vivo* con extractos elaborados a partir de *Ruta pinnata*, se tuvieron en consideración distintas referencias bibliográficas que describen el uso de las rutáceas, en la medicina tradicional. Aparte, este tipo de plantas también se ha demostrado que forman parte de la alimentación de animales. Por ejemplo, restos de los frutos de *Ruta pinnata* se han encontrado en las heces de los lagartos gigantes (*Gallotia galloti*) de la isla de Tenerife, por lo que podría concluirse que la planta no posee efectos citotóxicos, al menos en esta especie animal **(Rodríguez et al., 2008)**. Por otro lado, *Ruta pinnata* también es comúnmente utilizada en la isla de La Palma, donde es abundante, como alimento para el ganado cuando los animales presentan parasitaciones digestivas **(Ruiz et al., comunicación personal)**, siendo este hecho un indicio de su falta de toxicidad en rumiantes. Existen, además, ensayos recientes donde se han utilizado diferentes extractos elaborados a partir plantas de la familia de las rutáceas para evaluar la efecto frente a coccidiosis en pollos *in vivo*, en los cuales se ha demostrado, no sólo su actividad anticoccidiósica sino la ausencia de toxicidad de las mismas **(Jabbar et al., 2014)**. Además, como se comentó en los resultados, los animales que fueron tratados con los extractos, tanto el natural como el elaborado *in vitro*, no presentaron síntomas compatibles con intoxicación durante la experiencia *in vivo*.

En general, el uso medicinal de las rutáceas está bastante extendido por todo el mundo, especialmente en el área mediterránea. Por ejemplo, en Italia, el botánico Paolo María Guarrera refiere más de 100 usos de plantas pertenecientes al género *Ruta*: *Ruta angustifolia Pers.*, *Ruta chalepensis L.*, *Ruta corsica DC.*, y *Ruta graveolens L.* **(Guarrera, 2006)**. De hecho, las rutáceas se encuentran entre las plantas más usadas de forma general en la medicina tradicional contemporánea italiana, en la botánica y en la vida cotidiana. El uso intensivo de estas plantas no es específico de Italia, también está documentado en otras regiones del Mediterráneo y otros continentes. Otra especie, *Ruta genus*, ya se usaba abundantemente en la práctica médica de antaño en el Mediterráneo, según quedó documentado en el llamado *Corpus Hippocraticum*. Esta colección de 62 tratados fue escrita entre el quinto centenario de la a. C. y el segundo centenario de la d. C., y son atribuidos a los tiempos de Hipócrates **(Pollio et al., 2008)**.

Las preparaciones con las distintas especies de *Ruta* han sido administradas para infecciones de ojos y para diferentes tipos de dolores, e incluso como antídoto de venenos y mordeduras de animales venenosos. En la etnofarmacología tradicional mediterránea, las rutas se han considerado el remedio idóneo para las enfermedades femeninas y secundariamente como un efectivo remedio para las afecciones pulmonares. A estas plantas también se le atribuyen propiedades antirreumáticas y antihelmínticas. Esta última propiedad no sólo ha sido descrita en Italia sino también en países como Argelia, Bulgaria, Chipre, etc., según se recoge en la revisión realizada por **Pollio et al. (2008)**.

La actividad antihelmíntica y antiparasitaria de las rutáceas, y en particular de *Ruta graveolens*, fue descrita con detalle en un estudio realizado en el Norte de Italia por **Guarrera (1999)**. La planta se ha utilizado en combinación con azufre para tratar la sarna en perros y, tras cocción y mezcla con aceite de oliva, para eliminar moscas en granjas porcinas. La cocción de la planta también se ha empleado como brebaje para el

ganado en el tratamiento de las helmintiasis, incluso como vermífugo para niños acompañada de ajo o aceite de oliva, o administrada en tortas hechas de harina y agua de ruda. Finalmente, estudios realizados en British Columbia (Canadá) también han demostrado el empleo de *R. graveolens* en la práctica etnoveterinaria, concretamente en el tratamiento de endoparásitos en cerdos, gatos y perros, como *Giardia* y *Toxoplasma*, información recogida a partir de distintas fuentes, como naturalistas, herbolarios, tiendas de animales, farmacéuticos y veterinarios (**Lans et al., 2007**).

Como ya se ha comentado, los mecanismos responsables de la actividad de los extractos naturales utilizados en el presente trabajo frente a *H. contortus* y *E. ninakohlyakimovae*, sobre todo a los procedentes de *Ruta pinnata*, no han sido estudiados. Es posible que la actividad antiparasitaria de los extractos se deba a las propiedades bioactivas de las plantas y que éstas sean debidas a un alto contenido en metabolitos secundarios, como ya se ha demostrado en otras plantas. El alto contenido en taninos, ácido hidroxibenzoico, ácido hidroxicinámico y diferentes flavonoides pueden encontrarse en *Onobrychis viciifolia*, una planta en la que se ha observado actividad antiparasitaria en ovejas frente a coccidios (**Regos et al., 2009, Saratsis et al., 2012**). Estos compuestos poseen no sólo actividad anticoccidiósica sino también antihelmíntica frente a nematodos gastrointestinales de pequeños rumiantes, tal y como han citado autores como **Hoste et al. (2006, 2008)** y **Valderrábanos et al. (2010)**. Además, la actividad de un extracto no tiene por qué ser debida a un único compuesto, sino que podría serlo a varios, los cuales podrían ejercer su acción de forma independiente o trabajar conjunta o sinérgicamente. Si ocurre esto último, el extracto crudo siempre será más activo que cualquiera de los productos que pudieran ser fraccionados y separados a partir de él. Algunos estudios hacen referencia a la actividad sinérgica de diferentes extractos procedentes de una misma planta, como es el caso de las pertenecientes al género *Aspidosperma*. Así, en un trabajo realizado con alcaloides procedentes de estas plantas se observó que muchos de ellos actuaban conjuntamente y mostraban una alta actividad frente a *Plasmodium*. Además, estos extractos eran capaces de aumentar la actividad de la clororquina, producto que se utiliza como tratamiento de la malaria (**Mitaine-Offer, 2002**). También se han encontrado plantas cuyos extractos han mostrado una elevada actividad, en este caso antitumoral, cuando se han utilizado conjuntamente, siendo dicha actividad mayor que la que presentaba cada planta por separado. Un ejemplo lo constituyen las plantas *Rhizoma corydalis* y *Rhizoma cucurmae*, ambas plantas típicas de la medicina tradicional china (**Gao et al., 2009**).

En su conjunto, los resultados del presente estudio demuestran que los extractos elaborados a partir de la planta endémica *Ruta pinnata* presentan una marcada actividad antiparasitaria *in vitro* frente a nematodos y coccidios que afectan al ganado caprino, en particular, *H. contortus* y *E. ninakohlyakimovae*. Esta actividad se constató en diferentes estados evolutivos de ambos parásitos. En concreto, frente a *H. contortus* se observó una actividad tanto ovicida, larvicida como adulticida; mientras que frente a la especie de *Eimeria* objeto de estudio se demostró efecto sobre ooquistes y esporozoítos. Puesto que algunos de estos estados se desarrollan en el ciclo exógeno de ambos parásitos y se consideran como formas de resistencia (L3 y ooquistes), los extractos podrían emplearse como antisépticos, además de como

antiparasitarios endógenos. Por otro lado, el efecto antiparasitario de los extractos preparados a partir de cultivos *in vitro* de la planta, aunque no tan notorios como los obtenidos con los extractos naturales, abre la posibilidad de utilizar esta metodología para la obtención de material vegetal con actividad farmacológica a partir de plantas que, como *R. pinnata*, presentan una disponibilidad baja en estado natural por diversas razones. Al contrastar todos estos resultados *in vitro* con los obtenidos durante la experiencia *in vivo* se comprobó que la actividad de los extractos en este último caso no fue tan manifiesta, lo cual podría ser debido a diferentes circunstancias, tal y como se discutió anteriormente. El diseño de nuevos estudios *in vivo* utilizando distintas dosis, pautas de tratamiento, formulación, etc., y otros en los que se analice en profundidad la farmacocinética y biodisponibilidad de los extractos en el animal podría contribuir sin duda a optimizar el resultado. Con la misma finalidad, también podrían implementarse los métodos de producción de los cultivos *in vitro* de la planta. Como futuros trabajos relacionados con el presente estudio, también habrían de considerarse el fraccionamiento y la identificación de los compuestos activos responsables de la actividad anticoccidiósica y antihelmíntica, su posible síntesis química y producción. Por último, habría que remarcar que los resultados obtenidos para las especies parásitas del caprino *H. contortus* y *E. ninakohlyakimovae* podrían ser extrapolables a otros parásitos pertenecientes a los phylum Nematoda y Apicomplexa, respectivamente, tanto de animales como del hombre (por ejemplo, *Toxoplasma gondii*).

# Conclusiones

---



- Los extractos metanólicos elaborados a partir de la parte aérea sin fructificar de *Ruta pinnata*, *Psoralea bituminosa* y *Ruta graveolens* muestran una actividad antihelmíntica *in vitro* de moderada a alta frente *Haemonchus contortus*, y una actividad de ligera a moderada frente al coccidio *E. ninakohlyakimovae*, variable según el tipo de extracto. De forma general, los extractos de *R. pinnata* fueron los que presentaron una actividad antiparasitaria más destacada.
- La parte de la planta y el estado de maduración de los frutos de *Ruta pinnata* utilizados para la elaboración de los extractos influyen en el nivel de actividad antiparasitaria. Así, los extractos elaborados a partir de frutos presentaron mayor actividad antihelmíntica y anticoccidiósica que los elaborados a partir de la planta entera, y los frutos maduros mayor efecto frente a nematodos que los obtenidos de frutos verdes.
- La extracción con distintos disolventes a partir del extracto metanólico crudo permite obtener nuevos extractos con diferente actividad antiparasitaria, pero siempre igual o menor que la obtenida con el extracto original crudo. En general, los extractos elaborados con disolventes orgánicos presentaron mayor actividad larvicida que los acuosos, siendo las fracciones hexánica y de acetato de etilo los que mayor actividad mostraron.
- De todos los extractos naturales analizados, el extracto metanólico de frutos maduros de *Ruta pinnata* es el que presenta mayor actividad antihelmíntica y anticoccidiósica frente al conjunto de estados parasitarios utilizados en los ensayos *in vitro*.
- Los compuestos elaborados a partir de material vegetal de *Ruta pinnata* cultivado *in vitro* poseen una moderada actividad frente a las L3 y los vermes adultos de *Haemonchus contortus*, por lo que el cultivo *in vitro* de material vegetal de plantas con actividad antihelmíntica podría considerarse como una alternativa para la obtención de productos antiparasitarios en el caso de endemismos, plantas en peligro de extinción o cuyo acceso o disponibilidad sea escaso.
- Los compuestos obtenidos de cultivos *in vitro* de material vegetal de *Ruta pinnata* no muestran actividad anticoccidiósica, por lo que la metodología utilizada para la elaboración de estos productos vegetales no permitiría la obtención de compuestos activos frente a *Eimeria* spp.
- Los ensayos *in vitro* de citotoxicidad de *R. pinnata*, junto con las evidencias del uso de la planta en animales como alimento habitual o con fines fitoterápicos en la sabiduría tradicional, indicarían que la toxicidad de la planta sería baja o nula. De acuerdo con esto, en la experiencia *in vivo* no se observó ningún signo clínico asociado a intoxicación en ninguno de los animales tratados.
- Debido a diversos factores que no ha sido posible aclarar en el presente estudio, entre ellos la dosis y pauta de tratamiento empleados, la vías de administración y la formulación del producto, la administración de extractos de

*R. pinnata* a animales infectados con *H. contortus* y *E. ninakohlyakimovae* no mostró un efecto tan marcado como el observado en los ensayos *in vitro*, en particular a lo referente a la actividad anticoccidiósica. A pesar de esto, el extracto metanólico de frutos maduros fue capaz de reducir de forma significativa los recuentos fecales de huevos y mejorar del cuadro clínico en los animales tratados.

- Los diferentes extractos obtenidos a partir de *Ruta pinnata* presentan una notable actividad antiparasitaria que está dirigida frente a diversos estados evolutivos de ambos parásitos; en el caso de *H. contortus* frente a huevos, larvas y adultos y, en el caso de *E. ninakohlyakimovae*, frente a ooquistes y esporozoítos. Puesto que algunos de estos estados evolutivos son formas exógenas que se desarrollan en el medio, los extractos serían susceptibles de ser utilizados, no sólo como anticoccidiósicos o antihelmínticos, sino también como antisépticos en el control de ambas enfermedades.

# Resumen/Summary

---



Entre las parasitosis que afectan al ganado caprino destacan, por su prevalencia y patogenicidad, las producidas por el nematodo *Haemonchus contortus* y el coccidio *Eimeria ninakohlyakimovae*. Ambos infectan principalmente a animales jóvenes causando graves cuadros clínicos que conlleva a grandes pérdidas en la producción. El tratamiento y control de las enfermedades parasitarias se ha basado comúnmente en la aplicación de agentes químicos como los benzimidazoles y lactonas macrocíclicas para el tratamiento de nematodos, y las sulfonamidas o nitrofurazonas en el caso de los coccidios. El uso reiterado e inadecuado de estos productos ha llevado al desarrollo de resistencias, lo cual, sumado al creciente interés de los consumidores por sistemas de producción más orgánicos, además de otras circunstancias, ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas de control y tratamiento, más económicas, libres de residuos y compatibles con métodos de producción ecológicos. Entre estas alternativas, la fitoterapia ha cobrado, recientemente, una gran importancia en medicina veterinaria, como demuestra el incremento en el número de publicaciones de los últimos años en las que se evalúa la actividad de diversas plantas utilizadas en la medicina tradicional frente a las afecciones causadas por múltiples parásitos. El objetivo principal del presente estudio fue evaluar la actividad antihelmíntica y anticoccidiósica de extractos naturales elaborados a partir de diversas plantas de la flora canaria, en particular la especie endémica *Ruta pinnata* (*R. pinnata*), a la que se le atribuyen diferentes propiedades, tanto dermatológicas, antirreumáticas como antiparasitarias. Se analizaron extractos obtenidos a partir de planta entera de *R. pinnata*, *R. graveolens* y *Psoralea bituminosa*, frutos en distinto grado de maduración de *R. pinnata* y material vegetal procedente de cultivos *in vitro* de esta planta. Para la preparación de los extractos se emplearon diversos métodos de extracción y, entre los análisis, se incluyeron diversos test *in vitro*, además de un ensayo experimental *in vivo*, en los cuales se utilizaron diferentes formas evolutivas de los parásitos *H. contortus* y *E. ninakohlyakimovae*. Los resultados de los diferentes ensayos *in vitro* mostraron que, en general, los extractos naturales elaborados a partir de las tres plantas presentaban un grado variable de actividad antihelmíntica y anticoccidiósica, destacando la mostrada por los extractos de *R. pinnata*. Entre los extractos analizados de esta planta, aquel que mostró mayor actividad fue el extracto metanólico de frutos maduros. Este extracto redujo de forma significativa la movilidad de las larvas 3 de *H. contortus* a concentraciones reducidas y, en mayor o menor medida, inhibió el desarrollo larvario, detuvo el desarrollo de los huevos y comprometió la viabilidad de los vermes adultos. Así mismo, dicho extracto fue capaz de inhibir la esporulación de los ooquistes de *E. ninakohlyakimovae* y afectó de forma significativa tanto la viabilidad de los esporozoítos como su capacidad para invadir células. Por otro lado, al analizar los extractos procedentes de cultivos *in vitro* de *R. pinnata* se observaron resultados muy dispares dependiendo del medio de cultivo y disolvente utilizado aunque, de forma general, prácticamente todos presentaron un efecto sobre las L3 de *H. contortus*. El efecto antihelmíntico de la mayoría de ellos fue menor que el mostrado por los extractos naturales y no pudo demostrarse un efecto anticoccidiósico significativo. Finalmente, los resultados del ensayo *in vivo* demostraron que, tras el tratamiento con extractos naturales y procedentes de cultivos *in vitro*, se reducían los recuentos de huevos en heces. Sin embargo, mediante este ensayo no pudo demostrarse un efecto claro de ninguno de los dos extractos sobre los recuentos de ooquistes en heces. De

forma global, el presente estudio ha permitido demostrar una importante actividad antihelmíntica en la planta endémica canaria *R. pinnata* frente al nematodo caprino *H. contortus* y una moderada actividad anticoccidiósica frente al coccidio *E. ninakohlyakimovae*. El mecanismo de actuación, así como los componentes responsables de la actividad antiparasitaria de los diferentes extractos aún se desconocen, lo cual abre un abanico de posibilidades para futuros trabajos, en los que se podrían incluir, además, nuevos estudios *in vivo* en los que se evalúen diferentes formas de presentación, otras vías de administración y distintas dosis, entre otros aspectos. Por último, no sería descartable la evaluación de nuevos extractos (naturales, *in vitro* o sintéticos) e, incluso, la realización de ensayos con otros parásitos de importancia, no sólo en veterinaria, sino también en medicina humana.

The parasitosis produced by the nematode *Haemonchus contortus* and the coccidia *Eimeria ninakohlyakimovae* are among the most important for goat industry because of their prevalence and pathogenicity. Both parasites mainly infect young animals causing serious clinical features that, leading to substantial production losses. Treatment and control of parasitic diseases has been commonly based on the application of chemical agents like benzimidazoles and macrocyclic lactones for the nematode treatment and sulphonamides or triazine derivatives in case of coccidiosis. However, the intensive and inappropriate use of these products has led to the development of drug resistance, which, together with to the growing interest of consumers for more organic production systems, as well as other circumstances, has led to the search for new alternatives for control and treatment, more economic, free of residues and compatible with ecological production methods. Among these alternatives, phytotherapy has gained a great importance in veterinary medicine, as shown by the increased number of publications of recent years that evaluates the activity of different plants used in traditional medicine against the diseases caused by multiple parasites. The main objective of the present study was to evaluate the anthelmintic and anticoccidial activity of natural extracts from different plants of the Canarian flora, in particular those of the endemic species *Ruta pinnata* (*R. pinnata*), to whom both dermatological, antirheumatic and de-worming properties have been attributed. Different extracts obtained from the whole plant of *R. pinnata*, *R. graveolens* and *Psoralea bituminosa*, as well as from fruits in varying degrees of maturation of *R. pinnata* and vegetable material from *in vitro* cultures of this plant were analysed. For the preparation of the extracts different methods of extraction were carried out, and the analysis included several *in vitro* tests using different parasite stages of both *H. contortus* and *E. ninakohlyakimovae*. Additionally, an *in vivo* experiment for the assessment of the antiparasitic activity of *R. pinnata* was addressed. The results of the *in vitro* assays showed that, in general, natural extracts made from the three plants had a variable degree of anthelmintic and anticoccidial activity, particularly those of *R. pinnata*. Between tested extracts of this plant, methanolic extracts from mature fruits were those that showed the greatest activity. This extract significantly reduced the mobility of *H. contortus* L3 larvae at low concentrations and, to a varying extent, inhibited larval development, stopped the development of eggs and compromised the viability of adult worms. Likewise, this extract was able to inhibit the sporulation of *E. ninakohlyakimovae* oocysts and significantly affected both the viability of the sporozoites and its ability to invade cells. On the other hand, depending on the medium used for cultivation and the solvent employed at the extraction, a varying degree of activity against *H. contortus* L3 was observed in almost all the extracts made from *in vitro* cultures of *R. pinnata*. The anthelmintic effect of most of the *in vitro* derived products was less than that shown by natural extracts and failed to show a significant anticoccidial effect. Finally, the *in vivo* test results showed that, after treatment with both natural and *in vitro* derived extracts, the fecal egg counts were reduced. However, this trial failed to show a clear effect on fecal oocyst excretion. Globally, the present study could demonstrate an important anthelmintic activity in the Canarian endemic plant *R. pinnata* against the goat nematode *H. contortus* and a moderate activity against the coccidia *E. ninakohlyakimovae*. The mechanisms of action, as well as the components responsible for the antiparasitic activity of the different extracts are still unknown, which opens up

a range of possibilities for future work, that could include, in addition, new *in vivo* studies for the evaluation of different forms of presentation, other routes of administration and different doses, among other aspects. Finally, the evaluation of new extracts (natural, *in vitro* or synthetic) or even the assessment with other parasites, either of animal or human interest, would not be ruled out.

# Bibliografía

---



- ABARCA G. (1990):** Diagnóstico parasitológico gastrointestinal y pulmonar del hato caprino en la región del sureste del Valle Central de Costa Rica. Tesis Ing. Agr. Escuela de Zootecnia. Facultad de Agronomía. Universidad de Costa Rica. 120 p.
- ABDEL-SATTAR E., MAES L., SALAMA M.M. (2010):** *In vitro* of plants from Saudi Arabia against malaria, leishmaniasis, sleeping sickness and Chagas disease. *Phytother*
- ABI ABDALLAH D.S., DENKERS E.Y. (2012):** Neutrophils cast extracellular traps in response to protozoan parasites. *Front Immunology*. 3: 382.
- ABBOTT E.M., PARKINS J.J., HOLMES P.H. (1988):** Influence of dietary protein on the pathophysiology of haemonchosis in lambs given continuous infections. *Research of Veterinary Science*. 45: 41-49.
- ACHI Y.L., ZINSSTAG J., YAO K., YEO N., DORCHIES P., JACQUIET P. (2003):** Host specificity of *Haemonchus* spp. for domestic ruminants in the savanna in northern Ivory Coast. *Veterinary Parasitology*. 116: 151-158.
- ADAMU M., NAIDOO V., ELOFF J.C. (2013):** Efficacy and toxicity of thirteen plant leaf acetone extracts used in ethnoveterinary medicine in South Africa on egg hatching and larval development of *H. contortus*. *Veterinary Research*. 9:38.
- ADEMOLA I.O., ELOFF J.N. (2011):** *In vitro* anthelmintic effect of *Anogeissus leiocarpus* (DC.) Guill. & Perr. Leaf extracts and fractions on developmental stages of *Haemonchus contortus*. *African Journal of Traditional Complementary Alternative Medicine*. 8: 134-139.
- ALAWA C.B.I., ADAMU A.M., GEFU J.O., AJANUSI O.J., ABDU P.A., CHIEZEY N.P., ALAWA J.N., BOWMAN D.D. (2003):** *In vitro* screening of two Nigerian medicinal plants (*Vernonia amygdalina* and *Annona senegalensis*) for anthelmintic activity. *Veterinary Parasitology*. 113: 73-81.
- AL-IDREESI S.R., KWEIDER M., KATRANJI M.M. (2013):** Efficacy of *Eimeria tenella* (oocyst and sporozoite) proteins as a vaccine in broilers against coccidiosis. *International Journal of Poultry Science*. 12: 157-163.
- ALMEIDA F.A., GARCÍA K.C.O.D., TORGERSON P.R., AMARANTE A.F.T. (2010):** Multiple resistance to anthelmintic by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. *Parasitology International*. 59: 622-625.
- ALTAS M.G., ANGULO-CUBILLÁN F., CUQUERELLA M. (2009):** The prevalence of gastrointestinal nematodes in hair goats of the Sanliurfa region. *Turkiye Parazitoloji Dernegi*. 33: 20-24.
- ALYOUSIF M.S., KASI, A.A., AL-SHAWA Y.R (1992):** Coccidia of the domestic goat (*Capra hircus*) in Saudi Arabia. *International Journal for Parasitology*. Vol.22: 807-811.
- ANDERSONCO R.C. (1992):** Orden Strongylida (The Bursate Nematodes). 3.4 Superfamilia Trichostrongyloidea. *Nematode Parasites of Vertebrates. Their Development and Transmission*. C.A.B. International. Northampton. UK. Pp: 35-191.

- ANDREWS S.J., ROLPH T.P., MUNN E.A., TAYLOR, M.A. (1997):** Duration of protection immunity against ovine haemonchosis following vaccination with the nematode gut membrane antigen H11. *Research Veterinary Science*. 62: 223-227.
- ANOSA G.N., OKORO O.J. (2011):** Anticoccidial activity of the methanolic extract of *Musa paradisiaca* root in chickens. *Tropical Animal Health Production*. 43: 245-248.
- ARABKHAZAEI F., MODRISANEI M., NABIAN S., MANSOORI B., MADANI A. (2013):** Evaluating the resistance of *Eimeria* spp. field isolates to anticoccidial drugs using three different indices. *Iranian Journal Parasitology*. 8: 234-241.
- ASSIS L.M., BEVILAQUA C.M.L., MORAIS S.M., VIEIRA L.S., COSTA C.T.C., SOUZA J.A.L. (2003):** Ovicidal and larvicidal activity *in vitro* of *Spigelia anthelmia* Linn. Extracts on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 117: 43-49.
- AYAZ E., YILMAZ H., OZBEK H., TAS Z., ORUNC O. (2007):** The effect of *Nigella sativa* oil against *Aspicularis tetraptera* and *Hymenolepis nana* in naturally infected mice. *Saudi Medical Journal*. 28: 1654-1657.
- AYERS S., ZINK D.L., MOHN K., POWELL J.S., BROWN C.M., MURPHY T., BRAND R., PRETORIUS S., STEVENSON D., THOMPSON D., SINGH S.B. (2007):** Anthelmintic activity of alkaloids from *Cissampelos capensis*. *Plant Medicine*. 73: 296-297.
- AYERS S., ZINK D.L., MOHN K., POWELL J.S., BROWN C. M., MURPHY T., BRAND R., PRETORIUS S., STEVENSON D., THOMPSON D., SINGH S.B. (2008):** Flavones from *Struthiola argentea* with anthelmintic activity *in vitro*. *Phytochemistry*. 69: 541-545.
- BACHAYA H.A., IQBAL Z., KHAN M.N, SINDHU Z.U., JABBAR A. (2009):** Anthelmintic activity of *Ziziphus nummularia* (bark) and *Acacia nilotica* (fruit) against Trichostrongylid nematode of sheep. *Journal of Entopharmacology*. 123: 325-329.
- BADAWAY V.S., LUTZ K., TAUBERT A., ZAHNER H., HERMOSILLA C. (2009):** *Eimeria bovis* meronte I-carrying host cells express parasite-specific antigens on their surface membrane. *Veterinary Research Communications*. 34: 103-118.
- BAKER V.S., IMADE G.E., MOLTA N.B., TAWDE P., PAM, S.D., OBADOFIN M.O., SAGAY S.A., EGAH D.Z., IYA D., AFOLABI B.B., BAKER M., FORD K., FORD R., ROUX K.H., KELLER T.C. 3<sup>rd</sup> (2008):** Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in Plasmodium falciparum infected children under six years of age. *Malaria Journal*. 7: 41.
- BALIC A., BOWLES V.M., MEEUSEN E.N.T. (2000):** The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Advance in Parasitology*. 45: 181-241.
- BALIC A., BOWLES V.M., MEEUSEN E.N.T. (2002):** Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Parasite Immunology*. 24: 39-46.
- BALIC A., BOWLES V.M., LIU Y.S., MEEUSEN E.N.T. (2003):** Local immune response in sensitized sheep following challenge infection with *Teladorsagia circumcincta*. *Parasite Immunology*. 25: 375-381.
- BALLWEBER L.R. (2006):** Diagnostic methods for parasitic infections in livestock. *Veterinary Clinical North Animal Food Animal Practice*. 22: 695-705.

- BALUNAS M.J., LINIGTON R.G., TIDGEWELL K., FENNER A.M., UREÑA L.D., TOGNA G.D., KYLE D.E., GERWICK W.H. (2010):** Dragonamide E, a modified linear lipopeptide from *Lyngbya majuscula* with antileishmanial activity. *Journal Natural Products*. 73: 60-66.
- BANGOURA B., DAUGSCHIES A. (2007):** Parasitological and clinical parameters of experimental *Eimeria zuernii* infection in calves and influence on weight gain and haemogram. *Parasitology Research*. 100: 1331-1340.
- BANSAL S.K., SINGH K.V., SHERWANI M.R. (2009):** Evaluation of larvicidal efficacy of *Solanum xanthocarpum* storage against vector mosquitoes in north-western Rajasthan. *Journal of Environment Biology*. 30: 883-888.
- BASSET C., HOLTON J., O'MAHONY R., ROITT I. (2003):** Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccines*. 21: 12-23.
- BEDRNIK P. (1989):** The role of different *Eimeria* species in a prospective coccidiosis vaccine. In: Yvone. P. (Ed). *Coccidian and Intestinal Cocciomorphs*. INRA, France: Tours, pp. 667-670.
- BEHNKE J.M., CHIEJINA S.N., MUSONGONG G.A., FAKAE B.B., EZEOKONKWO R.C., NNADI P.A., NGONGEH L.A., JEAN E.N., WAKELIN D. (2006):** Naturally occurring variability in some phenotypic markers and correlates of haemonchotolerance in West African Dwarf goats in a subhumid zone of Nigeria. *Veterinary Parasitology*. 141: 107-121.
- BEHRENDT J.H., HERMOSILLA C., HARDT M., FAILING K., ZAHNER H., TAUBERT A. (2008):** PMN-mediated immune reactions against *Eimeria bovis*. *Veterinary Parasitology*. 151: 97-109.
- BEHRENDT J.H., RUIZ A., ZAHNER H., TAUBERT A., HERMOSILLA C. (2010):** Neutrophil extracellular trap formation as innate immune reactions against the apicomplexan parasite *Eimeria bovis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 133: 1-8.
- BENAVIDES M.V., SONSTEGARD T.S, KEMP S., MUGAMBI J.M., GIBSON J.P, BAKER R.L., HANOTTE O., MARSHALL K., VAN TASELL C. (2015):** Identification of novel loci associated with gastrointestinal parasite resistance in a Red Maasai x Doper backcross population. *Plos One*. 10: e0122797.
- BERENQUER J. (2006):** Manual de parasitología: morfología y biología de parásitos de interés sanitario. Barcelona. Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona.
- BIFFA D., JOBRE Y., CHAKKA H. (2007):** Ovine helminthosis, a major health constraint to productivity of sheep in Ethiopia. *Animal Health Research Reviews*. 7: 107-118.
- BOUBAKER R., AKKARI H., B'CHIR F., GHARBI M., MHADHBI M., AWADI S., DARGHOOUTH M.A. (2013):** *Thymus capitatus* from Tunisian arid zone: chemical composition and *in vitro* anthelmintic effects on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 197: 374-378.
- BRADACS G., MAES J., HEILMANN J. (2010):** *In vitro* cytotoxic, antiprotozoal and antimicrobial of medicinal plants from Vanuatu. *Phytotherapy Research*. 24: 800-809.

- BRAMWELL D. (1998):** Flora of the Canary Islands English version pocket guide. Rueda 1st edition.
- BRAMWELL D. (2004):** Plantas medicinales de las Islas Canarias. Editorial Rueda, Madrid.
- BRAMWELL D., BRAMWELL Z. (2002):** Flores silvestres de las Islas Canarias. Rueda 2, 4ª edición.
- BRICARELLO P.A., AMARANTE A.F., ROCHA R.A., CABRAL FILHO S.L., HUNTLEY J.F., HOUDIJK J.G., ABDALLA A.L., GENNARI S.M. (2005):** Influence of dietary protein supply on resistance to experimental infections with *Haemonchus contortus* in Ile de France and Santa Ines lambs. Veterinary Parasitology. 134: 99-109.
- BRINKMANN V., REICHARD U., GOOSMANN C., FAULER B., UHLEMANN Y., WEISS D.S., WEINRAUCH Y., ZYCHILNSKY A. (2004):** Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science. 303: 5663.
- BRINKMANN V., ZYCHILNSKY A. (2012):** Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? The Journal of Cell Biology. 198: 773-783.
- BURKE J.M., MILLER J.E., TERRILL T.H., ORLIK S.T., ACHARYA M., GARZA, J.J MOSJIDIS J.A. (2013):** *Sericea lespedeza* as an aid in the control of *Eimeria* spp. In lambs. Veterinary Parasitology. 193:39-46.
- BURT S.A., TERSTEEG-ZIJDERVELD M.H.G., JONGERIUS-GORTEMMAKER B.G.M., VERVELDE L., VERNOOIJ J.C.M. (2013):** *In vitro* inhibition of *Eimeria tenella* invasion of epithelial cells by phytochemicals. Veterinary Parasitology. 191: 374-378.
- CAMURÇA-VASCONCELOS A.L., BEVILAQUA C.M., MORAIS S.M., MACIEL M.V., COSTA C.T., MACEDO I.T., OLIVEIRA L M., BRAGA R.R., SILVA R.A., VIEIRA L.S., NAVARRO A.M. (2008):** Anthelmintic activity of *Lippia sidoides* essential oil on sheep gastrointestinal nematodes. Veterinary Parasitology. 154: 167-170.
- CALA A.C., CHAGAS A.C.S., OLIVEIRA M.C.S., MATOS A.P., BORGES I.M.F., SOUSA I.A.D., SOUZA F.A., OLIVERIA G.P. (2012):** *In vitro* anthelmintic effect of *Melia azedarach* L. and *Trichilia clausenii* C. against sheep gastrointestinal nematodes. Experimental Parasitology. 130: 98-102.
- CALA A.C., FERREIRA J.F.S., CHAGAS A.C.S., GONZÁLEZ J.M., RODRIGUEZ R.A.F., FOGGIO M.A., OLIVEIRA M.C.S., SOUZA I.M.O, MAGALHÃES P.M., JÚNIOR W.B. (2014):** Anthelmintic activity of *Artemisia annua* L. extracts *in vitro* and the effect of an aqueous extract and artemisinin in sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes. Parasitology Reserach. 113: 2345-2353.
- CANALS A., GASBARRE L.C. (1990):** *Ostertagia ostertagi*: isolation and partial characterization of somatic and metabolic antigens. International Journal of Parasitology. 20: 1047-1057.
- CARRIJO DE OLIVEIRA T., OLIVEIRA D.A., ROSTKOWSKA C., RIBEIRO S., FERRO E.A.V., MELILLO P., MINEO J.R. (2009):** *Toxoplasma gondii*: Effects of *Artemisia annua* L. on susceptibility to infection in experimental models *in vitro* and *in vivo*. Experimental Parasitology. 122: 233-241.

- CARVALHO C.O., CHAGAS A.C., COTINGUIBA F., FURLAN M., BRITO L.G., CHAVES F.C., STEPHAN M.P., BIZZO H.R., AMARATE A.F. (2012):** The anthelmintic effect of plants extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. *Veterinary Parasitology*. 183: 260-268.
- CASILLAS J.A., MENDOZA DE GIVES P., LÓPEZ-ARELLANO M.E., LIÉBANO E. (2008):** Evaluation of multinutritional pellets containing *Duddingtonia flagrans* chlamydospore for the control of ovine haemonchosis. *Annals of New York Academy of Science*. 1149: 161-163.
- CEDRÓN J.C., OBERTI J.C., ESTÉVEZ-BRAUN A., RAVELO A.G., Del ARCO-AGUILAR M., LÓPEZ M. (2009):** *Pancratium canariense* as an importante source of amarylklidaceae alkaloids. *Journal of Natural Products*. 72: 112-116.
- CHAPMAN H.D., JEFFERS T.K., WILLIAMS R.B. (2010):** Forty years of monensin for the control of coccidiosis in poultry. *Poultry Science*. 89: 1788-1801.
- CHARTIER C., YVORÉ P., PORS I., MANCASSOLA R. (1994):** Absence of protection against *Eimeria ninakohlyakimovae* after primo-infection with *E. ovinoidalis* in new-born kids. *Veterinary Research*. 25: 66-70.
- CHHABRA R.C., PANDEY V.S. (1991):** Coccidia of goats in Zimbabwe. *Veterinary Parasitology*. 39: 199-205.
- CHOBOTAR R.C., SCHOLTYSECK O. (1982):** Ultraestructure. In: Long P (ed) *The biology of coccidian*. University Park Press, Baltimore, Maryland (USA).
- CLARK C.H., KIESEL G.K., GOBY C.H. (1962):** Measurement of bloods loss caused by *Haemonchus contortus* infections in sheep. *American Journal of Veterinary Research*. 23: 977-980.
- CLAEREBOUT E., VERCRUYSSSE J. (2000):** The immune response and the evaluation of acquired immunity against gastrointestinal nematodes in goats in cattle. A review. *Parasitology*. 120: 25-42.
- COLDITZ I.G., LE JAMBRE L.F. (2008):** Development of a faecal occult blood test to determine the severity of *Haemonchus contortus* infections in sheep. *Veterinary Parasitology*. 153: 93-99.
- COLES G.C., ROUSH R.T. (1992):** Slowing the spread of anthelmintic resistant nematodes of sheep and goats in the UK. *Veterinary Record*. 130: 505-510.
- COLLADO V., PORRAS E., CUTULI M.Y., GÓMEZ-LUCÍA E. (2008):** El sistema inmune innato I: sus mecanismos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*. 2: 1-16.
- COLVILLE J. (1991):** Common Laboratory Procedures for Diagnosing Parasitism. En: *Diagnostic Parasitology for Veterinary Technicians*. Ed. Paul W. Pratt. American Veterinary Publications, Inc. California. USA. pp: 7-50.
- COMES A.M., HUMBERT J.F., CABARET J., FLARD L. (1996):** Using molecular tools for diagnosis in veterinary parasitology. *Veterinary Research*. 27: 33-342.

- CONSTANTINOIU C.C., MOLLOY J.B., JORGENSEN W.K., COLEMAN G.T. (2007):** Development and validation of an ELISA for detecting antibodies to *Eimeria tenella* in chickens. *Veterinary Parasitology*. 150: 306-313.
- COX G.N., PRATT D., HAGERMAN R., BOISVENUE R.J. (1990):** Molecular cloning and primary sequence of a cysteine protease expressed by *Haemonchus contortus* adults worms. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 41: 25-34.
- CUQUERELLA M., GÓMEZ-MUÑOZ M.T., CARRERA L., DE LA FUENTE C., ALUNDA J.M. (1994):** Cross antigenicity among ovine trichostrongyloidea. Preliminary report. *Veterinary Parasitology*. 53: 243-251.
- DAI Y.B., LIU X.Y., LIUM M., TAO J.P. (2006):** Pathogenic effects of the coccidium *Eimeria ninakholyakimovae* in goats. *Veterinary Research Communications*. 30: 142-60.
- DAKKAK A., FIORAMONTI J., BUENO L. (1981):** *Haemonchus contortus* third stage larvae in sheep: kinetics of arrival into the abomasum and transformation during rumino-omasal transit. *Research of Veterinary Science*. 31: 384-385.
- DALTON J.P., MULCAHY G. (2001):** Parasite vaccines-a reality?? *Veterinary Parasitology*. 98: 149-167.
- DARGIE J.D., ALLONBY E.W. (1975):** Pathophysiology of single and challenge infections of *Haemonchus contortus* in Merino sheep: studies on red cell kinetics and the "self-cure" phenomenon. *International Journal of Parasitology*. 5: 147-157.
- DAUGSCHIES A., NAJDROWSKI M. (2005):** Eimeriosis in cattle: current understanding. *Journal of Veterinary Medicine*. 52: 417-427.
- del CACHO E., GALLEGO M., FRANCESCH M., QUÍLEZ J., SÁNCHEZ-ACEDO C. (2010):** Effect of artemisinin on oocyst Wall formation and sporulation during *Eimeria tenella* infection. *Parasitology International*. 59: 506-511.
- DERBALA A.E., EL-RAHMAN E.H. (2001):** Potency of three *Haemonchus contortus* antigens in the diagnosis of ovine haemonchosis. *J Egypt Soc Parasitol*. 31: 701-710.
- de la FUENTE C., ALUNDA J.M. (1992):** A quantitative study of *Eimeria* infections of goats from central Spain. *Veterinary Parasitology*. 41: 7-15.
- de SOUZA M.F., PIMENTEL-NETO M., SANTOS de PINHO A., da SILVA R., BATISTA FARÍAS A.C., GUIMARÃES M.P. (2013):** Seasonal distribution of gastrointestinal nematode infections in sheep in a semiarid region, northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*. 22: 351-359.
- DE VEER M.J., KEMP J.M., MEEUSEN E.N. (2007):** The innate host defense against nematode parasites. *Parasite Immunology*. 29: 1-9.
- DICKER A.J., INGLIS N.F., MANSON E.D., SUBHADRA S., ILLANGOPATHY M., MUTHUSAMY R., KNOX D.P. (2014):** Proteomic analysis of *Mecistocirrus digitalis* and *Haemonchus contortus* intestinal protein extracts and subsequent efficacy testing in a vaccine trial. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 8 (6):e2909. doi. 10.1371/journal.pntd.0002909. eCollection 2014.

- DING X., LILLEHOJ H.S., DALLOUL R.A, MIN W., SATO T., YASUDA A., LILLEHOJ E.P. (2005):** In ovo vaccination with the *Eimeria tenella* EtMIC2 gene induces protective immunity against coccidiosis. *Vaccine*. 23: 3733-3740.
- DOLINSKÁ M., IVANIŠINOVÁ KÖNOGOVÁ A., VÁRADY M. (2014):** Anthelmintic resistance in sheep gastrointestinal nematodes in Slovakia detected by *in-vitro* methods. *BMC Veterinary Research*. 10: 233.
- DOMÍNGUEZ-TORANO L.A., CUQUERELLA M., GÓMEZ-MUÑOZ M.T., MÉNDEZ S., FERNÁNDEZ-PÉREZ F.J., ALUNDA J.M. (2000):** Vaccination of Manchego lambs against *Haemonchus contortus* with a somatic fraction (p26/23) of adult parasites. *Parasite-Immunology*. 22: 131-138.
- DWIGHT D. BOWMAN (2004):** Georgis' parasitology for veterinarians. 1<sup>st</sup> Edition Published by Elsevier. España
- ECKERT J., BRAUN R., SHIRLEY M.W., COUDERT P. (1995) COST 89/820 BIOTECHNOLOGY.** Guidelines on techniques in coccidiosis research. Official for official publications of the European communities. Luxembourg (Belgium), pp. 113-116.
- EKIER H., GOMÓLKA E. (2000):** Furanocoumarins in *Pastinaca sativa* L. *in vitro* culture. *Pharmazie*. 55: 618-620.
- EL-ON J., OZER L., GOPAS J., SNEIR R., ENAY H., LUFT N., DAVIDOY G., GOLAN-GOLDHIRSH A. (2009):** Antileishmanial activity in Israeli plants. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 103: 297-306.
- EQUALE T., TILAHUN G., DEBELLA A., FELEKE A., MAKONNEN E. (2007a):** *Haemonchus contortus*: *in vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of aqueous and hydro-alcoholic extracts of *Hedera helix*. *Experimental Parasitology*. 116: 340-345.
- EQUALE T., TILAHUN G., DEBELLA A., FELEKE A., MAKONNEN E. (2007b):** *In vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of crude extracts of *Coriandrum sativum* against *Haemonchus contortus*. *Jornal Ethnopharmacol*. 110: 428-433.
- FABER J.E., KOLLMANN D., HEISE A., BAUER C., FAILING K., BÜRGER H.J., ZAHNER H. (2002):** *Eimeria* infections in cows in the periparturient phase and their calves: oocysts excretion and levels of specific serum and colostrum antibodies. *Veterinary parasitology*. 104: 1-17.
- FAIZAL A.C., RAJAPAKSE R.P. (2001):** Prevalence of coccidian and gastrointestinal nematode infections in cross bred goats in the dry areas of Sri Lanka. *Small Ruminant Research*. 40: 233-238.
- FERREIRA L.E., CASTRO P.M.N. CHAGAS A.C.S., FRANÇA S.C., BELEBONI R.O. (2013):** *In vitro* anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. *Experimental Parasitology*. 134: 327-332.
- FLECK S.L., MOODY A.H. (1988):** Faecal parasites. En: *Diagnostic Techniques in Medical Parasitology*. Ed. Wright. Cambridge. Reino Unido; pp: 8-52.
- FOREYT W.J. (1990):** Coccidiosis and cryptosporidiosis in sheep and goats. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 6: 665-670.

- FÖLLMAN W., WEBER S., BIRKNER S. (2000):** Primary cell cultures of bovine colon epithelium: isolation and cell culture colonocytes. *Toxicology In vitro*. 14: 435-445.
- FRIEND S.C., STOCKDALE P.H. (1980):** Experimental *Eimeria bovis* infection in calves: a histopathological study. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. 44: 129-140.
- FUCHS T.A, ABED U., GOSSMANN C., HURWITZ R., SCHULZE I., WAHN V., WEINRAUCH Y., BRINKMANN V., ZYCHLINSKY A. (2007):** Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology*. 176: 231-241.
- GACHET M.S., KUNERT M., BRUN R., MUÑOZ R.A., BAUER R., SCHÜHLY W. (2010):** Jacarone-Derived glucosidic esters from *Jacaranda glabra* and their activity against *Plasmodium falciparum*. *Journal of Natural Products*. 73: 553-556.
- GADELHAG S.M., ARAFA W.M., ABOELHADID S.M. (2015):** Molecular characterization of *Eimeria* species naturally infecting Egyptian baldi chickens. *Iran Journal of Parasitology*. 10: 87-95.
- GAO J.L., HE T.C., LI Y.B., WANG Y.T. (2009):** A traditional chinese medicine formulation consisting of *Rhizoma corydalis* and *Rhizoma curcumae* exerts synergistic anti-tumor activity. *Oncology Reports*. 22: 1077-83.
- GARCÍA J.A. (2007):** Citoquinas, en **Gómez-Lucía E., Blanco M.M., Doménech A. (2007):** Manual de Inmunología Veterinaria. Pearson-Prentice Hall. 12: 209-228.
- GAULY M., KRAUTHAHN C., BAUER C., ERHARDT G. (2001):** Pattern of *Eimeria* oocyst output and repeatability in naturally infected suckling Rhön lambs. *Journall of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. 48: 665-673
- GIANNENAS I., FLOROU-PANERI P., PAPAZHARIADOU M., CHISTAKI E., BOTSOGLOU N.A., SPAIS A.B. (2003):** Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. *Arch Tieremahr*. 57: 99-106.
- GILL H.S. (1991):** Genetic control of acquired resistance to haemonchosis in Merino lambs. *Parasite Immunology*. 13: 617-628.
- GITHIORI J.B., HÖGLUND J., WALLER P.J., BAKER R.L. (2002):** Anthelmintic activity of preparations derived from *Myrsine Africana* and *Rapanea melanophloeos* against the nematode parasite, *Haemonchus contortus*, of sheep. *Journal of Ethnopharmacology*. 80: 187-191.
- GÓMEZ-LUCÍA E. (2007):** El complejo mayor de histocompatibilidad, en **Gómez-Lucía E., Blanco M.M., Doménech A. (2007):** Manual de Inmunología Veterinaria. Pearson-Prentice Hall. 7: 117-136.
- GÓMEZ-MUÑOZ M.T., DOMÍNGUEZ I.A., GÓMEZ-IGLESIAS L.A., FERNÁNDEZ-PÉREZ F.J., MÉNDEZ S., DE LA FUENTE C., ALUNDA J.M., CUQUERELLA M. (2000):** Serodiagnosis of haemonchosis with a somatic antigen (Hc26) in several breeds of sheep. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 12: 354-360.
- GONZÁLEZ J.F., HERNÁNDEZ A., MEEUSEN E.N., RODRÍGUEZ F., MOLINA J.M., RAADSMA H.W., PIEDRAFITA D. (2011):** Fecundity in adult *Haemonchus contortus*

parasites is correlated with abomasal tissue eosinophils and  $\gamma\delta$  T cells in resistant Canaria Hair Brees sheep. *Veterinary Parasitology*. 10: 3-4.

**GRADÉ J.T., ARBLE B.L., WELADJI R.B., VAN DAMME P. (2008):** Anthelmintic efficacy and dose determination of *Albizia anthelmintica* against gastrointestinal nematodes in naturally infected Ugandan sheep. *Veterinary Parasitology*. 157: 267-274.

**GREGORY M.W., CATCHPOLE J. (1990):** Ovine coccidiosis: the pathology of *Eimeria crandallis* infection. *International Journal of Parasitology*. 20: 849-860.

**GUARRERA P.M. (1999):** Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in Central Italy. *Journal of Ethnopharmacology*. 68:183-292.

**GUARRERA P.M. (2006):** Usi e tradizioni della flora italiana. Aracne, Roma. p432.

**GUIMÃRAES J.S., GOMEL A.L.G., DA CUNHA T.C.B., GARCIA J.L. (2007):** *In vitro* evaluation of the disinfection efficacy on *Eimeria tenella* unsporulated oocysts isolated from broilers. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*. 16: 67-71.

**GUNIA M., PHOCAS F., GOURDINE J.L, BIJMA P., MANDONNET N. (2013):** Simulated selection responses for breeding programs including resistance and resilience to parasites in Creole goats. *Journal Animal Science*. 91: 572-581.

**HAHN S., GIAGLIS S., CHOWDHURY C.S., HOSLI I., HASLER P. (2013):** Modulation of neutrophil NETosis: interplay between infectious agents and underlying host physiology. *Seminars in Immunopathology*. 35: 439-453.

**HALLIDAY A.M., ROUTLEDGE C.M., SMITH S.K., MATTHEWS J.B., SMITH W.D. (2007):** Parasite loss and inhibited development of *Teladorsagia circumcincta* in relation to the kinetics of the local IgA response in sheep. *Parasite Immunology*. 29: 425-434.

**HARIDY F.M., DAWOUD H.A., MORSY T.A. (2004):** Efficacy of *Commiphora molmol* (Mirazid) against sheep naturally infected with moniezia *expansa* in Al-Santa Center, Gharbia Governorate, Egypt. *Journal of Egyptian Society of Parasitology*. 34: 775-782.

**HARPER C.K., PENSHORN B.L. (1999):** Occurrence and diversity of coccidian in indigenous, Saanen and crossbred goats in South Africa. *Veterinary Parasitology*. 82: 1-9.

**HARTUNG T., DASTON G. (2009):** Are *in vitro* test suitable for regulatory use? *Toxicological sciences*. 111: 233-237.

**HECKENDORN F., HÄRING D.A., MAURER V., SENN M., HERTZBERG H. (2007):** Individual administration of three tanniferous forage plants to lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei*. *Veterinary Parasitology*. 146: 123-134.

**HERMOSILLA C., BURGER H.J., ZAHNER H. (1999):** T cell responses in calves to a primary *Eimeria bovis* infection: phenotypical and functional changes. *Veterinary Parasitology*. 84: 49-64.

**HERMOSILLA C., ZAHNER H., TAUBERT A. (2006):** *Eimeria bovis* modulates adhesion molecule gene transcription in and PMN adhesion to infected bovine endothelial cells. *International Journal of Parasitology*. 36: 423-431.

- HERMOSILLA C., CARO T.M., SILVA L., RUIZ A., TAUBERT A. (2014):** The intriguing host innate immune response: novel anti-parasitic defense by neutrophil extracellular traps. *Parasitology*. 141: 1489-1498.
- HIDALGO M.R., CORDERO DEL CAMPILLO, M. (2000):** Parasitosis del aparato digestivo. Coccidiosis. En **Cordero Del Campillo M., Rojo F.A., Martínez A.R., Sánchez M.C., Hernández S., Navarrete I., Díez P., Quiroz H., Carvahlo M. (2000):** Parasitología Parasitaria. McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U. España. Pág. 195-212.
- HOLM S.A., SÖRENSEN C.R.L., THAMSBORG S.M., ENEMARK H.L. (2014):** Gastrointestinal nematodes and anthelmintic resistance in Danish goat herds. *Parasite*. 21:37.
- HOOPER K.J., BOBE G., VORACHEK W.R., BISHOP-STEWART J.K., MOSHER W.D., PIRELLI G.J., KENT M.L., HALL J.A. (2014):** Effect of selenium yeast supplementation on naturally acquired parasitic infection in ewes. *Biological Trace Element Research*. 161: 308-317.
- HOSTE H., CHARTIER C., LE FRILEUX Y. (2002):** Control of gastrointestinal parasitism with nematodes in dairy goats by treating the host category at risk. *Veterinary Research*. 33: 531-545.
- HOSTE H., JACKSON F., ATHANASIADOU S., THAMSBORG S.M., HOSKIN S.O. (2006):** The effect of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends of Parasitology*. 22: 253-61.
- HOSTE H., TORRES-ACOSTA J.F., ALONSO-DIAZ M.Á., BRUNET S., SANDOVAL-CASTRO C., ADOTE S.H. (2008):** Identification and validation of biocative plants for the control of gastrointestinal nematodes in small ruminants. *Tropical Biomedicine*. 25:56-72.
- HUGHES H.P., SPEER C.A., KYLE J.E., DUBEY J.P. (1987):** Activation of murine macrophages and a bovine monocyte cell line by bovine lymphokines to kill the intracellular pathogens *Eimeria bovis* and *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity*. 55: 784-791.
- IQBAL Z., LATEEF M., JABBAR A., MUHAMMAD G., KHAN M.N. (2005):** Anthelmintic activity of *Calotropis procera* (Ait.) Ait. F. flowers in sheep. *Journal of Ethnopharmacology*. 102: 256-261.
- IQBAL Z., LATEEF M., KHAN M.N., JABBAR A., AKHTAR M.S. (2006):** Anthelmintic activity of *Swertia chirata* against gastrointestinal nematodes of sheep. *Fitoterapia*. 77: 463-465.
- IQBAL Z., LATEEF M., JABBAR A., GHAYUR M.N., GILANI A.H. (2006):** *In vitro* and *In vivo* anthelmintic activity of *Nicotiana tabacum* L. leaves against gastrointestinal nematodes of sheep. *Phytotherapy Research*. 20: 46-48.
- IQBAL A., TARIQ K.A., WAZIR V.S., SINGH R. (2013):** Antiparasitic efficacy of Artemisia absinthium, toltrazuril and amprolium against intestinal coccidiosis in goats. *Journal of Parasitology Diseases*. 37: 88-93.

- JABBAR A., ARFAN ZAMAN M., IQBAL Z., YASEEN M., SHAMIM A. (2007):** Anthelmintic activity of *Chenopodium album* (L.) and *Caesalpinia crista* (L.) against trichostrongylid nematode of sheep. *Journal of Entropharmacology*. 114: 86-91.
- JABBAR A., CHAND N., SADDIQUE U., BAILEY C.A., KHAN R.U. (2014):** Antiparasitic effect of wild rue (*Peganum harmala* L.) against experimentally induced coccidiosis in broiler chicks. *Parasitology Research*. 113: 2951-2960.
- JACOBS H.J., WILSHIRE C., ASHMAN K., MEEUSEN E.N.T. (1999):** Vaccination against the gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus* using a purified larval surface antigen. *Vaccine*. 17: 362-368.
- JALILA A., DORNY P., SANI R., SALIM N.B., VERCRUYSE J. (2008):** Coccidial infections of goats in Selangor, peninsular Malaysia. *Veterinary Parasitology*. 74: 165-172.
- JANEWAY C.A.Jr. (2001):** How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*. 98: 7461-7468.
- JAVANBAKHT J., HOSSEINI E., MOUSAVI S., HASSAN M.A., SALEHZADEH KAZERONI S., KHAKI F., FATTAHI R., JANI M., ALIMOHAMMADI S. (2014):** Evaluation of two Iranian domestic ovine breeds for their pathological findings to gastrointestinal infection of *Haemonchus contortus*. *Journal of Parasitology Disease*. 38: 311-316.
- JEFFERS T.K. (1975):** Attenuation of *Eimeria tenella* through selection for precociousness. *Journal of Parasitology*. 61: 1083-1090.
- JENKINS M.C., PARKER C., O'BRIEN C., PERSYN J., BARLOW D., MISKA K., FETTERER R. (2013):** Protecting chickens against coccidiosis in floor pens by administering *Eimeria* oocysts using gel beads or spray vaccination. *Avian Dis*. 57: 622-626.
- JOLLEY W.R., BARDSLEY K.D. (2006):** Ruminant coccidiosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 22: 613-621.
- JONH A.E., THOMAS M.S, BERLIN A.A., LUKACS N.W. (2005):** Temporal production of CCL28 corresponds to eosinophil accumulation and airway hyperreactivity in allergic airway inflammation. *American Journal of Pathology*. 166: 345-353.
- KANRUNAMOORTHI K., IIANGO K. (2010):** Larvicidal activity of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. And *Croton macrosrachyus* Del. against *Anopheles arabiensis* Patton, a potent malaria vector. *European Review for Medical and Pharmacological Science*. 14: 57-62.
- KANYARI P.W. (1993):** The relationship between coccidian and helminth infections in sheep and goats in Kenya. *Veterinary Parasitology*. 51: 137-141.
- KAPLAN R.M. (2004):** Drug resistance in nematodes of veterinary importance. A status report. *Trends of Parasitology*. 20: 477-481.
- KARANU F.N., RURANGIRWA F.R., MCGUIRE T.C., JASMER D.P. (1993):** *Haemonchus contortus*: identification of proteases with diverse characteristics in adult worm excretory-secretory products. *Experimental of Parasitology*. 77: 362-371.

- KATRIS N.J., van DOOREN G.C., McMILLAN P.J., HANSEN E., TILLEY L., WALLER R.F. (2014):** The apical complex provides a regulated gateway for secretion of invasion factors in *Toxoplasma*. *Plos Pathogen*. 10 (4): e1004074 doi: 10.1371/journal.ppat.1004074.
- KAWAZOE U., DI FABIO J. (1994):** Resistance to diclazuril in field isolates of *Eimeria* species obtained from commercial broiler flocks in Brazil. *Avian pathology*. 23: 305-311.
- KHALAFALLA R.E., MÜLLER U., SHAHIDUZZAMAN M.D., DYACHENKO V., DESOUKY A.Y., ALBER G., DAUGSCHIES A. (2011):** Effects of curcumin (diferuloylmethane) on *Eimeria tenella* sporozoites *in vitro*. *Parasitology Research*. 108: 897-886.
- KIM H.C., HEALEY J.M. (2001):** Effects of pine bark extract administered to immunosuppressed adult mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *The American Journal of Chinese Medicine*. 29: 469-475.
- KIMBITA E.N., SILAYO R.S., MWEGA E.D., MTAU A.T., MROSO J.B. (2009):** Studies on the *Eimeria* of goats at Madagu dairy farm SUA, Morogoro, Tanzania. *Tropical Animal Health and Production*. 41: 1263-1265.
- KNOX D.P., SMITH S.K., SMITH W.D. (1999):** Immunization with an affinity purified protein extract from the adult parasite protects lambs against infection with *Haemonchus contortus*. *Parasitology Immunology*. 27: 121-126.
- KNOX M.R., JOSH P.F., ANDERSON L.J. (2002):** Deployment of *Duddingtonia flagrans* in an improved pasture system: dispersal, persistence, and effects on free-living soil nematodes and microarthropods. *Biological Control*. 24: 176-182.
- KOMMURU D.S., BARKER T., DESAI I., BURKE J.M., RAMSAY A., MUELLER-HARVEY I., MILLER J.E., MOSJIDIS J.A., KAMISSETTI N., TERRIL T.H. (2014):** Use of pelleted *Sericea lespedeza* (*Lespedeza cuneata*) for natural control of coccidia and gastrointestinal nematodes in weaned goats. *Veterinary Parasitology*. 29: 3-4.
- KOSKI K.G., SCOTT M.E. (2003):** Gastrointestinal nematodes, trace elements, and immunity. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*. 16: 237-251.
- KOUDELA B., BOKOVA A. (1998):** Coccidiosis in goats in the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*. 76: 26-267.
- KOYAMA K., TAMAUCHI H., ITO Y. (1995):** The role of CD4<sup>+</sup> T cells in protective immunity to the murine nematode parasite *Trichuris muris*. *Parasite Immunology*. 17: 161-165.
- 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*. 141: 273-278.
- LACROUX C., NGUYEN T.H., ANDREOLETTI O. (2006):** *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. *Veterinary Research*. 37: 604-622.
- LANS C. (1998):** Ethnoveterinary medicines used for ruminants in Trinidad and Tobago. *Preventive Veterinary Medicine*. Doi: 10.1016/S0167-5877(98)000666-X

- LANS C., TURNER N., KHAN T., BRAUER G. (2007):** Enthoveterinary medicines used to treat endoparasites and stomach problems in pigs and pets British Columbia, Canada. *Veterinary Parasitology*. 148: 325-340.
- LICHTENFELS J.R., PILITT P.A. (2000):** Synlope patterns of the Haemonchinae of ruminants (Nematoda: Trichostrongyloidea). *Journal of Parasitology*. 86: 1093-1098.
- LICHTENFELS J.R., PILITT P.A., GIBBONS L.M., BOOMKER J.D. (2001):** *Haemonchus horaki* n. sp. (Nematoda: Trichostrongyloidea) from the grey rhebuck *Pelea capreolus* in South Africa. *Journal of Parasitology*. 87: 1095-1103.
- LILLEHOJ H.S., BACON L.D. (1991):** Increase of intestinal intraepithelial lymphocytes expressing CD8 antigen following challenge with *Eimeria acervulina*. *Avian Diseases*. 35: 294-301.
- LINDQVIST A., LJUNGSTRÖM B.L., NILSSON O., WALLER P. J. (2001):** The dynamics, prevalence and impact of nematode infections in organically raised sheep in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 42: 377-389.
- LOGTERS T., MARGRAF S., ALTRICHTER J., CINATL J., MITZNER S., WINDOLF J, SCHOLZ M. (2009):** The clinical value of neutrophil extracellular traps. *Medical Microbiology and Immunology*. 198: 211-219.
- LYNDAL-MURPHY M., EHRLICH W.K., MAYER D.G. (2014):** Anthelmintic resistance in ovine gastrointestinal nematodes in inland southern Queensland. *Australian Veterinary Journal*. Volume 92. No 11.
- MA D., MA C., PAN L., LI G., HONG J., CAI H., REN X. (2011):** Vaccination of chickens with DNA vaccine encoding *Eimeria acervulina* 3-1E and chicken IL-15 offers protection against homologous challenge. *Experimental Parasitology*. 127: 208-214.
- MACEDO I.T.F., BEVILAQUA, C.M.L., DE OLIVEIRA, L.M.B., CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F., MORAIS, S.M., MACHADO, L.K.A., RIBEIRO, W.L.C. (2012):** *In vitro* of *Lantana camara*, *Alpinia zerumbet*, *Mentha villosa* and *Tagetes minuta* dections on *Haemonchus contortus* eggs and larvae. *Veterinary Parasitology*. 190: 504-509.
- MACIEL M.V. MORAIS S.M., BEVILAQUA C.M.L., CAMURÇA-VASCONCELOS A.L.F., COSTA C.T.C., CASTRO C.M.S. (2006):** Ovicidal and larvicidal activity of *Melia azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 140: 98-104.
- MADIBELA O.R., KELEMOGILE K.M. (2008):** Exposure of *Melia azedarach* fruits to *Eimeria* lower oocyst ouyput in yearling Tswana goats. *Small Ruminant Research*. 76: 207-210.
- MAFF (1986):** Central Veterinary Laboratory, New Haw, Weybrifge, Surrey. *Parasitology* 92: 279-289.
- MAFF (1989):** *Helminthology*. London: Her Majesty's Stationery Office. Reino Unido: 1-68.
- MAGALHÃES L.G., KAPADIA G.J., da SILVA TONUCCI L.R., CAIXETA S.C., PARREIRA N.A., RODIQUES V., Da SILVA FILHO A.A. (2010):** *In vitro* schistosomicidal effects of some phloroglucinol derivates from *Dryopteris* species against *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitology Research*. 106: 395-401.

- MAPHOSA V., MASIKA P.J. (2011):** The potential of *Elephantorrhiza elephantine* as an anthelmintic in goats. *Parasitology Research*. 111: 881-888.
- MAPHOSA V., MASIKA P.J. (2012):** *In vivo* validation of *Aloe ferox* (Mill). *Elephantorrhiza elephantine* Bruch. Skeels. and *Leonotis leonorus* (L) R. BR as potential anthelmintic and antiprotozoal against mixed infections of gastrointestinal nematodes in goats. *Parasitology Research*. 110: 103-108.
- MARIE-MAGDELEINE C., HOSTE H., MAHIEU M., VARO H., ARCHIMEDE H. (2009):** *In vitro* effects of *Cucurbita moschata* seed extracts on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 161: 99-105.
- MARIE-MAGDELEINE C., UDINO L., PHILIBERT L., BOCAGE B., ARCHIMEDE H. (2014):** *In vitro* effects of *Musa x paradisiaca* extracts on four developmental stages of *Haemonchus contortus*. *Research in Veterinary Science*. 96: 127-132.
- MARKOVICS A., COHEN I., MUKLADA H., GLASSER T.A., DVASH L., UNGAR E.D., AZAIZEH H., LANDAU S.Y. (2012):** Consumption of *Pistacia lentiscus* foliage alleviates coccidiosis in young goats. *Veterinary Parasitology*. 186: 165-169.
- MARTIN S., MOLINA J.M., HERNÁNDEZ Y., FERRER O., MUÑOZ M.C., LÓPEZ A., ORTEGA L., RUIZ A. (2015):** Influence of immunoprotection on genetic variability of cisteyne proteinases from *Haemonchus contortus* adults worms. *International Journal of Parasitology*. In press.
- MATOS L., RUIZ R., HERMOSILLA C., TAUBERT A., MUÑOZ M.C., RODRIGUEZ F., ANDRADA M., PÉREZ D., LÓPEZ A., MOLINA J.M. (2011):** Respuestas inmunoprotectoras en cabritos de 4 semanas frente a la coccidiosis caprina producida por *Eimeria ninakohlyakimovae*. XII Congreso de Parasitología. Zaragoza (España). 320.
- MAURYA R., GUPTA P., CHAND K., KUMAR M., DIXIT P., SINGH N., DUBE A. (2009):** Constituents of *Tinospora sinensis* and their antileishmanial activity against *Leishmania donovani*. *Natural Product Research*. 23: 1134-1143.
- McCLURE S.J., EMERY D.L., STEEL J.W. (2000):** Host resistance to gastrointestinal parasite of sheep. In: *Ruminant Physiology Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction*. 73: 552-555.
- McDONALD V., SHIRLEY M.W. (2009):** Past and future: vaccination against *Eimeria*. *Parasitology*. 136: 208-214.
- McRAE K.M., McEWAN J.C., DODDS K.G., GEMMELL N.J. (2014):** Signatures of selection in sheep bred for resistance or susceptibility to gastrointestinal nematodes. *Biomedical Central Genomic*. 15: 637-650.
- McDOUGALD L.R., MATHIS G.F., SEIBERT B.P. (1990):** Anticoccidial efficacy of diclazuril against recent field isolates of *Eimeria* from commercial poultry farms. *Avian Diseases*. 34: 911-915.
- MEANA A., ROJO F.A. (2000):** Tricoststrongilidosis y otras nematodosis. En *Cordero Del Campillo M., Rojo F.A., Martínez A.R., Sánchez M.C., Hernández S., Navarrete I., Díez P., Quiroz H., Carvahlo M. (2000): Parasitología Parasitaria*. McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U. España. Pág: 237-253.

- MEHLHORN H. (2004):** Encyclopedic reference of parasitology. 2<sup>nd</sup> ed. Springer-Verlag Heidelberg. Düsseldorf (Germany).
- METCALFE D.D. (2008):** Mast cells and mastocytosis. *Blood*. 112: 946-956.
- MICHELS M.G., BERTOLINI L.C.T., ESTEVES A.F., MOREIRA P., FRANCA S.C. (2011):** Anticoccidial effects of coumestans from *Eclipta alba* for sustainable control of *Eimeria tenella* parasitosis in poultry production. *Veterinary Parasitology*. 177: 55-60.
- MILLER H.R. (1990):** Immunity to internal parasites. *Revue Scientifique el Technique*. 9: 301-344.
- MILLER J.E., HOROHOV D.W. (2006):** Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. *Journal of Animal Science*. 84: 124-132.
- MISHRA V., PARVEEN N., SINGHAL K.C., KHAN N.U. (2005):** Antifilarial activity of *Azadirachta indica* on cattle filarial parasite *Setaria cervi*. *Fitoterapia*. 76: 54-61.
- MISNI N., SULAIMAN S., OTHMAN H., OMAR B. (2009):** Repellency of essential oil of *Piper aduncum* against *Aedes albopictus* in the laboratory. *Journal of American Mosquito Control Association*. 25: 442-447.
- MITAINE-OFFER AC, SAUYAIN M., VALENTIN A., CALLAPA J., MALLIÉ M., ZÈCHES-HANROT, M. (2002):** Antiplasmodial activity of aspidosperma índole alkaloids. *Phytomedicine*. 9: 142-145.
- MOLAN A.L., LIU Z., DE S. (2009):** Effect of pine bark (*Pinus radiata*) extracts on sporulation of coccidian oocysts. *Folia Parasitological*. 56: 1-5.
- MOLINA J.M., McKEAN J.B., RODRIGUEZ E., GUTIERREZ A., HERNANDEZ S. (1994):** Caracterización de proteasas presentes en vermes adultos de una cepa ovina de *Haemonchus contortus*. X Reunión Anual de la Asociación de Parasitólogos Españoles. Barcelona-Sitges; pp85.
- MOLINA J.M., GUTIÉRREZ A. C., RODRÍGUEZ-PONCE E., VIERA J. A., HERNÁNDEZ S. (1997):** Abomasal nematodes in goats from the subtropical island of Grand Canary (Spain). *Veterinary Research*. 28: 259-270.
- MOLINA J.M., RUIZ A., RODRÍGUEZ-PONCE E., GUTIÉRREZ A.C., GONZÁLEZ J., HERNÁNDEZ S. (1999):** Cross-reactive antigens of *Haemonchus contortus* adult worms in *Teladorsagia circumcincta* infected goats. *Veterinary Research*. 30: 393-399.
- MOLINA J.M., MARTÍN S., HERNÁNDEZ Y., GONZÁLEZ J.F., FERRER O., RUIZ A. (2012):** Immunoprotective effect of cysteine proteinasa fractions from two *Haemonchus contortus* strains adapted to sheep and goats. *Veterinary Parasitology*. 188: 53-59.
- MONTEIRO M.V., BEVILAQUA C., MORAIS S., ANDRADE MACHADO L., CAMURÇA-VASCONELAS A., CANPELLO C., RIBEIRO W., MESQUITA M. (2011):** Anthelmintic activity of *Jatropha curcas* L. seeds on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 182: 259-263.
- MORAND-FEHR P., RICHARD A., TESSIER A., HERVIEU J. (2002):** Effects of decoquinato on the growth and milk performance of young female goats. *Small Ruminant Research*. 45: 104-114.

- MORRIS B.C., DANFORTH H.D., CALDWELL D.J., PIERSON F.W., McELROY A.P. (2004):** Intestinal mucosal mast cell immune response and pathogenesis of two *Eimeria acervulina* isolates in broiler chickens. *Poultry Science*. 83: 1667-1674.
- MORRISSETTE N.S., SIBLEY L.D. (2002):** Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiology and molecular biology reviews*. 66: 21-38.
- MUNDT H.C., DAUGSCHIES A., UEBE RINKE M. (2003):** Efficacy of toltrazuril against artificial infections with *Eimeria bovis* in calves. *Parasitology Research*. 90: 166-167.
- MUNDT H.C., BANGOURA B., RINKE M., ROSENBRUCH M., DAUGSCHIES A. (2005):** Pathology and treatment of *Eimeria zuernii* coccidiosis in calves: investigations in an infection model. *Parasitology International*. 54: 223-230.
- MUNN E.A., GREENWOOD C.A., COADWELL W.J. (1987):** Vaccination of young lambs by means of a protein fraction extracted from adult *Haemonchus contortus*. *Parasitology*. 94: 385-397.
- MUÑOZ-CARO T., HERMOSILLA C., SILVA L.M.R., CORTES H., TAUBERT A. (2014):** Neutrophil extracellular traps as innate immune reaction against the emerging Apicomplexan parasite *Besnoitia besnoiti*. *Plos One*. 9.
- NAIDOO V., McGAW L.J., BISSCHOP S.P.R., DUNCAN N., ELOFF J.N. (2008):** The value of plant extracts with antioxidant activity in attenuating coccidiosis in broiler chickens. *Veterinary Parasitology*. 153: 214-219.
- NEBUYENKA I., RUBAIRE-AKIIKI C., OLILA D., MUHANGI D., HÖGLUND J. (2014):** Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes in goats and evaluation of FAMACHA diagnosis marker in Uganda. *Veterinary Parasitology*. 205: 666-675.
- NETTLES V.F., QUIST C.F., LOPEZ R.R., WILMERS T.J., FRANK P., ROBERTS W. CHITWOOD S., DAVIDSON, W.R. (2002):** Morbidity and mortality factors in key deer (*Odocoileus virginianus clavium*). *Journal of Wildlife Diseases*. 38: 685-692.
- NGINYI J.M., DUNCAN J.L., MELLOR D.J., STEAR M.J., WANYANGU S.W., BAIN R.K., GATONGI P.M. (2001):** Epidemiology of parasitic gastrointestinal nematode infections of ruminants on smallholder farms in central Kenya. *Research of Veterinary Science*. 70: 33-39.
- NKEWENGOUA E.T., NGANTCHOU I., NYASEE B., DENIER C., BLONSKI C., SCHNEIDER B. (2009):** *In vitro* inhibitory effects of palmatine from *Enantia chlorantha* on *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum*. *Natural Product Research*. 23: 1144-1150.
- NNADI P.A., KAMALU T.N, ONAH D.N. (2007):** The effect of dietary protein supplementation on the pathophysiology of *Haemonchus contortus* infection in West African Dwarf goats. *Veterinary Parasitology*. 148: 256-261.
- NOLAN A., GOLDRING O.L., CATCHPOLE M.W., JOYNER L.P. (1987):** Demonstration of antibodies to *Eimeria* species in lambs by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Research of Veterinary Science*. 42: 119-123.

- NUSSBAUM J.C., Van DYKEN S.J., Von MOLTKE J., CHENG L.E., MOHAPATRA A., MOLOFSKY A.B., THORNTON E.E., KRUMMEL M.F., CHAWLA A., LIANG H.E., LOCKSLEY R.M. (2013):** Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. *Nature*. 502: 245-248.
- NWEZE N.E., OBIWULU I.S. (2009):** Anticoccidial effects of *Argentarium conyzoides*. *Journal of Ethnopharmacology*. 122: 6-9.
- O'CONNOR L.J., WALKDEN-BROWN S.W., KAHN L.P. (2006):** Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Veterinary Parasitology*. 142: 1-15.
- O'GRADY M.R., SLOCOMBE J.O. (1980):** An investigation of variables in a fecal flotation technique. *The Canadian Journal of Comparative Medicine*. 44: 148-157.
- ONYEYILI P.A., NWOSU C.O., AMIN J.D., JIBIKE J.I. (2001):** Anthelmintic activity of crude aqueous extract of *Nauclea latifolia* stem bark against ovine nematodes. *Fitoterapia*. 72: 12-21.
- PALMER D.G., McCOMBE I.L. (1996):** Lectin staining of trichostrongylid nematode eggs of sheep: rapid identification of *Haemonchus contortus* eggs with peanut agglutinin. *International Journal of Parasitology*. 26: 447-450.
- PANDEY V.S., NDAO M., KUMAR V. (1994):** Seasonal prevalence of gastrointestinal nematodes in communal land goats from the highveld of Zimbabwe. *Veterinary Parasitology*. 51: 241-248.
- PAUL W.E., SEDER R.A. (1994):** Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*. 76: 241-251.
- PAULY T., ELBERS K., KONIG M., LENGFELD T., SAALMULLER A., THIEL H.J. (1995):** Classical swine fever virus-specific cytotoxic T lymphocytes and identification of a T cell epitope. *Journal of General Virology*. 76: 3039-3049.
- PEEK H.W., LADNMAN W.J.M. (2003):** Resistance to anticoccidial drugs of Dutch avian *Eimeria* spp. field isolates originating from 1996, 1999 and 2001. *Avian Pathology*. 32: 391-401.
- PÉREZ D., RUIZ A., MUÑOZ M.C., MOLINA J.M., HERMOSILLA C., LÓPEZ A.M., MATOS L., ORTEGA L., MARTÍN S., TAUBERT A. (2015a):** Modulation of the pro-inflammatory molecules E-selectin and TNF- $\alpha$  gene transcription in *Eimeria ninakohlyakimovae* infected primary caprine host endothelial cells. *Parasitology International*. 64: 471-477.
- PÉREZ D., RUIZ A., MUÑOZ M.C., MOLINA J.M., TAUBERT A., MUÑOZ-CARO T., SILVA L.M.R., HERMOSILLA C. (2015b):** Caprine monocyte-derived innate reactions against *Eimeria ninakohlyakimovae* results in extracellular traps formation and enhanced cytokine-chemokine (IL12, TNF- $\alpha$ , IL6, CCL2) gene transcription. *In press*.
- PÉREZ D., MUÑOZ M.C., MOLINA J.M., TAUBERT A., HERMOSILLA C., MUÑOZ-CARO T., SILVA L., RUIZ A. (2015c):** Caprine neutrophil-derived innate reactions against *Eimeria ninakohlyakimovae* result in neutrophil extracellular traps formation and enhanced cytokine/chemokine (IL12, TNF- $\alpha$  and IL6) gene transcription. *In press*.

**PÉREZ DE PAZ P.L., HERNÁNDEZ C.E. (1999):** Plantas medicinales o útiles en la flora canaria: aplicaciones populares. Ed. Francisco Lemus, La Laguna (Tenerife).

**PÉREZ J., ZAFRA R., BUFFONI L., HERNÁNDEZ S., CÁMARA S., MÁRTINEZ-MORENO A. (2008):** Cellular phenotypes in the abomasal mucosa and abomasal lymph nodes of goats infected with *Haemonchus contortus*. *Journal of Comparative Pathology*. 138: 102-107.

**PERVEZ K., ASHRAF M., NHANJIRA A.H. (1994):** Anthelmintic efficacy of *Melia azedarach* (Bakin) LINN, against gastrointestinal nematodes in sheep. *Pakistan Veterinary Journal*. 14: 135-137.

**PETIT A., PERY P., LUFFAU G. (1981):** Circulating antigens in ovine haemonchosis. *Annals Research of Veterinary*. 12: 1-9.

**POLLIO A. DE NATALE A., APPETITI E., ALIOTTA G., TOUWAIDE A. (2008):** Continuity and change in the Mediterranean medical tradition: *Ruta* spp. (rutaceae) in Hippocratic medicine and present practices. *Journal of Ethnopharmacology*. 116: 469-482.

**PRASAD A., NASIR A., SINGH N. (2008):** Detection of anti-*Haemonchus contortus* antibodies in sheep by dot-ELISA with immunoaffinity purified fraction of ES antigen during prepatency. *Indian Journal of Experimental Biology*. 46: 94-99.

**PRATT D., ARMES L.G., HAGERMAN R., REYNOLDS V., BOISVENUE R.J., COX G.N. (1992):** Cloning and sequence comparisons of four distinct cysteine proteases expressed by *Haemonchus contortus* adult worms. *Molecular Biochemical Parasitology*. 51: 209-218.

**QAMARUDDIN, PARVEEN N., KHAN N.U., SINGHAL K.C. (2002):** Potential antifilarial activity of the leaves and seeds extracts of *Psoralea corylifolia* on cattle filarial parasite *Setaria cervi*. *Journal of Ethnopharmacology*. 82: 23-28.

**RAZAVI S.M., HASHEMNIA M., KHODAKARAM-TAFTI A. (2014):** *Eimeria arloingi*: further studies on the development of some endogenous stages. *Experimental Parasitology*. 140: 12-17.

**RAZAK U.N.A.A., ONG C.B., YU T.S., LAU L.K. (2014):** *In vitro* micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Malaysia. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 57: 23-28.

**REGOS I., URBANELLA A., TREUTTER D. (2009):** Identification and quantification of phenolic compounds from the forage legume sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 57: 5843-52.

**REIS E SOUZA (2004):** Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr Opin in Immunology*. 16: 21-25.

**RHOADS M.L., FETTERER H.R. (1995):** Developmentally regulated secretion of cathepsin L-like cysteine proteases by *Haemonchus contortus*. *Journal of Parasitology*. 8: 505-512.

**RITZI M.M., ABDELRAHMAN W., MOHN M., DALLOUL R.A. (2014):** Effects of probiotics and application methods on performance and response of broiler chickens to an *Eimeria* challenge. *Poultry Science*. 93: 2772-2778.

- ROSENBERG B., JUCKETT D.A., AYLSWORTH C.F., DIMITROV N.V., HO S.C., JUDGE J.W., KESSEL S., QUENSEN J., WONG K.P., ZLATKIN I. (2005):** Protein from intestinal *Eimeria* protozoan stimulates IL-12 release from dendritic cells, exhibits antitumor properties in vivo and is correlated with low intestinal tumorigenicity. *International Journal of Cancer*. 114: 756-765.
- RUIZ A., GONZÁLEZ J.F., RODRÍGUEZ E., MARTÍN S., HERNÁNDEZ Y.I., ALMEIDA R., MOLINA J.M. (2006):** Influence of climatic and management factors on *Eimeria* infections in goats from semi-arid zones. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. 53: 399-402.
- RUIZ A., BEHRENDT J., ZAHNER H., HERMOSILLA C., PÉREZ D., MATOS L., MUÑOZ M.C., MOLINA J.M., TAUBERT A. (2010):** Development of *Eimeria ninakholyakimovae* *in vitro* in primary and permanent cell lines. *Veterinary Parasitology*. 173: 2-10.
- RUIZ A., GUEDES A., MUÑOZ M.C., MOLINA J.M., HERMOSILLA C., MARTÍN S., HERNÁNDEZ Y., HERNÁNDEZ A., PÉREZ D., MATOS L., LÓPEZ A.M., TAUBERT A. (2012):** Control and strategies using diclazuril against coccidiosis in goat kids. *Parasitology Research*. 110: 2131-2136.
- RUIZ A., MATOS L., MUÑOZ M.C., HERMOSILLA C., MOLINA J.M., ANDRADA M., RODRÍGUEZ F., PÉREZ D., LÓPEZ A., GUEDES A., TAUBERT A. (2013):** Isolation of an *Eimeria ninakholyakimovae* field strain (Canary Islands) and analysis of its infection characteristics on goat kids. *Research of Veterinary Science*. 94: 277-294.
- RUIZ A., MUÑOZ M.C., MOLINA J.M., HERMOSILLA C., ANDRADA M., LARA P., BORDÓN E., PÉREZ D., LÓPEZ A.M., MATOS L., GUEDES A., FALCÓN S., FALCÓN Y., MARTÍN S., TAUBERT A. (2014):** Immunization with *Eimeria ninakholyakimovae*-live attenuated oocysts protect goat kids from clinical coccidiosis. *Veterinary Parasitology*. 199: 8-17.
- SADJADI S.M., ZOHARIZADEH M.R., PANJESHAHIN M.R. (2008):** *In vitro* screening of different *Allium sativum* extracts on hydatid cysts protoscoleces. *Journal of Investigative Surgery*. 21: 318-322.
- SALINAS LORENTE J. (2007):** Inmunidad frente a agentes eucariotas patógenos, en **Gómez-Lucía E., Blanco M.M., Doménech A. (2007):** Manual de Inmunología Veterinaria. Pearson-Prentice Hall. 22: 449-470.
- SALVADOR M.J., SARTORI F.T., SACILOTTO A.C., PRAL E.M., ALFIERI S.C., VICHNEWSKI W. (2009):** Bioactivity of flavonoids isolated from *Lychnophora markgravii* against *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 64: 509-512.
- SAMAHA H.A., HAGGAG Y.N., NOSSAIR M.A., HABIB H.M. (2013):** Assessment efficiency of some chemical disinfectants commonly used against coccidian in poultry farms. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*. 39: 82-90.
- SARATSIS A., REGOS I., TZANIDAKIS N., VOUTZOURAKIS N., STEFANAKIS A., TREUTER D., JOACHIM A., SOTIRAKI S. (2012):** *In vivo* and *in vitro* efficacy of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) against *Eimeria* spp in lambs. *Veterinary Parasitology*. 188: 1-9.

- SCALA A. (2006):** Physiopathological mechanisms of abomasal Trichostrongylidae infections in small ruminants. *Parasitology*. 48: 403-408.
- SCHALLIG H.D. (2000):** Immunological responses of sheep to *Haemonchus contortus*. *Parasitology*. 120: 63-72.
- SCHALLIG H.D., VAN LEEUWEN M.A., HENDRIKX W.M. (1994):** Immune responses of Texel sheep to excretory/secretory products of adult *Haemonchus contortus*. *Parasitology*. 108: 351-357.
- SCHOENIAN S. (2005):** Internal parasite control (IPM). Maryland Cooperative Extension. University of Maryland. USA.
- SENGER C.M. (1959):** Chemical inhibition of sporulation of *Eimeria bovis* oocysts. *Experimental Parasitology*. 8: 244-248.
- SHANMUGASUNDARAM R., SIFRI M., SELVARAJ R.K. (2013):** Effects of yeast cell product supplementation on broiler cecal microflora species and immune responses during an experimental coccidial infection. *Poultry Science*. 92: 1195-1201.
- SHARAFI A., HASHEMI H. (2014):** *In vitro* regeneration and Agrobacterium mediated genetic transformation of *Artemisia aucheri* Boiss. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. Doi: 10.1007/s12298-014-0248-0.
- SHEHAB N.G., MONEM A.R., HASSAN E.S., TOALEB N.I. (2009):** Botanical study of *Meryta denhamii* Seem. And its anthelmintic activity against *Fasciola gigantica*. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 39: 269-288.
- SHIRLEY M.W., MILLAR B.J. (1986):** Studies on the immunogenicity of seven attenuated lines of *Eimeria* given as a mixture to chickens. *Avian Pathology*. 15: 629-638.
- SHOHEIB Z.S., EI-NOUBY K.A., DEYAB F.A., DAR Y.D., HABBASH A.M. (2008):** Potential effect of *Curcuma longa* extracts on infectivity and pathogenicity of *Schistosoma mansoni* cercariae. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 38: 141-159.
- SIEDEK E. M., BURDEN D., VON SAMSON-HIMMELSTJERNA G. (2006):** Feasibility of genus-specific real-time PCR for the differentiation of larvae from gastrointestinal nematodes of naturally infected sheep. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*. 119: 303-307.
- SILVA L.M.R., MUÑOZ-CARO T., GERSBERGER R., VILA-VIÇOSA M.J., CORTES H.C.E., HERMOSILLA C., TAUBERT A. (2014):** The apicomplexan parasite *Eimeria arloingi* induces caprine neutrophil extracellular traps. *Parasitology Research*. 113: 2797-2807.
- SIMPSON H.V., LAWTON D.E., SIMCOCK D.C., REYNOLDS G.W., POMROY W.E. (1997):** Effects of adult and larval *Haemonchus contortus* on abomasal secretion. *International Journal of Parasitology*. 27: 825-831.
- SINGH K., KAUR M., RUP P.J., SINGH J. (2009a):** Effects of Indian coral tree, *Erythrina indica* lectin on eggs and larval development of melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae*. *Journal of Environmental Biology*. 30: 509-514.

- SINGH T.U., KUMAR D., TANDAN S.K., MISHRA S.K. (2009b):** Inhibitory effect of essential oils of *Allium sativum* and *Piper longum* on spontaneous muscular activity of liver fluke, *Fasciola gigantica*. *Experimental Parasitology*. 123: 302-308.
- SLOSS M.W., KEMP R.L., ZAJAC A.M. (1994):** *Veterinary Clinical Parasitology*. Editado por Sloss, M.W. y por Kemp, R.L. American Association of Veterinary Parasitologists. Iowa. USA.
- SMITH G. (1990):** Chemotherapy: future problems. In: Schad, G.A., Warren, K.S. (Eds.), *Hookworm Disease: Current Status and New Directions*. Taylor & Francis. London, U.K. 291-303.
- SMITH M.C., SHERMAN D.M. (2009):** *Goat medicine*. 2<sup>nd</sup> ed. Wiley-Blackwell.
- SMITH W.D. (1993):** Protection in lambs immunised with *Haemonchus contortus* gut membrane proteins. *Research in Veterinary Science*. 54: 94-101.
- SOBHON P. (2009):** *Fasciola gigantica*: anthelmintic effect of the aqueous extract of *Artocarpus lakoocha*. *Experimental Parasitology*. 122: 289-298.
- SOE A.K., POMROY W.E. (1992):** New species of *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the domesticated goat *Capra hircus* in New Zeland. *Systematic Parasitology* 23: 195-202.
- SOLIS P.N., LANG'AT C., GUPTA M.P., KIRBY G.C., WARHURST D.C., PHILIPSON J.D. (1995):** Bio-active compounds from *Psychotria camponutans*. *Planta Medicinal*. 61: 62-65.
- SOULSBY E.J.L. (1988):** *Parasitología y Enfermedades Parasitarias*. 7<sup>a</sup> edición. Interamericana. México, D. F. México.
- SOUZA M.M.C., BEVILAQUA C.M.L., MORAIS S.M., COSTA C.T.C., SILVA A.R.A., BRAZ-FILHO R. (2008):** Anthelmintic cetogenin from *Annona squamosa* L. Seeds. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 80: 271-277.
- STANILOVA M., GORGOROV R., TREDAFILOVA A., NIKOLOVA M., VITOKOVA A. (2012):** Influence of nutrient medium composition on *in vitro* growth, polyphenolic content and antioxidant activity of *Achelimilla mollis*. *Natural Product Communications*. 7: 761-766.
- STEAR M.J., DOLIGALSKA M., DONSKOW-SCHMELTER K. (2007):** Alternatives to anthelmintics for the control of nematodes in livestock. *Parasitology*. 134: 139-151.
- STRAIN, S. A. J., STEAR, M. J. (2001):** The influence of protein supplementation on the immune response to *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunology*. 23: 523-531.
- STRIEPEN B., JORDAN C.N., REIFF S., DOOREN G.G (2007):** Building the perfect parasite: cell division in Apicomplexa. *Plos Pathology*. 3: 78
- STROMBERG B.E. (1997):** Environmental factors influencing transmission. *Veterinary Parasitology*. 72: 247-256.
- SUNITIBALA H., DAMAYANTI M., SHARMA G.J. (2001):** *In vitro* propagation and rhizome formation in *Curcuma longa* Linn. *Cytobios Journal*. 105: 71-82.

- SÜHWOLD A., HERMOSILLA C., SEEGER T., ZAHNER H., TAUBERT A. (2010):** T cell reactions of *Eimeria bovis* primary and challenge-infected calves. *Parasitology Research*. 106: 595-605.
- TADESSE D., EQUALE T., GIDAY M., MUSSA A. (2009):** Ovicidal and larvicidal activity of crude extracts of *Maesa lanceolata* and *Plectranthus punctatus* against *Haemonchus contortus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 122: 240-244.
- TARIQ K.A., CHISHTI M.Z., AHMAD F., SHAWL A.S. (2008):** Epidemiology of gastrointestinal nematodes of sheep managed under traditional husbandry system in Kashmir valley. *Veterinary Parasitology*. 158: 138-143.
- TARIQ K.A., CHISHTI M.Z., AHMAD F., SHAWL A.S. (2009):** Anthelmintic activity of extracts of *Artemisia absinthium* against ovine nematodes. *Veterinary Parasitology*. 160: 83-88.
- TAUBERT A., ZAHNER H., HERMOSILLA C. (2006):** Dynamics of transcription of immunomodulatory genes in endothelial cells infected with different coccidian parasites. *Veterinary Parasitology*. 142: 214-222.
- TAUBERT A., HERMOSILLA C., SÜHWOLD A., ZAHNER H. (2008):** Antigen-induced cytokine production in lymphocytes of *Eimeria bovis* primary and challenge infected calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 126: 309-320.
- TAUBERT A., BEHRENDT J.H., SÜHWOLD A., ZAHNER H., HERMOSILLA C. (2009):** Monocyte and macrophages mediated immune reactions against *Eimeria bovis*. *Veterinary Parasitology*. 164: 141-153.
- TAUBERT A., WIMMERS K., PONSUKSILI S., JIMENEZ C.A, ZAHNER H., HERMOSILLA C. (2010):** Microarray- based transcriptional profiling of *Eimeria bovis*-infected bovine endothelial host cells. *Veterinary Research*. 41: 70.
- TAYLOR M.A., CATHPOLE J., MARSHALL J., MARSHALL R.N., HOEBEN D. (2003):** Histopathological observations on the activity of diclazuril (Vecoxan) against the endogenous stages of *Eimeria crandallis* in sheep. *Veterinary Parasitology*. 116: 305-214.
- TAYLOR M.A., COOP R.L., WALL R. (2007):** *Veterinary Parasitology*. 3<sup>rd</sup> ed. Blackwell. Oxford (UK).
- TAYLOR W.A., BOOMKER J., KRECEK R.C., SKINNER J.D., WATERMEYER R. (2005):** Helminths in sympatric populations of mountain reedbuck (*Redunca fulvorufula*) and gray rhebok (*Pelea capreolus*) in South Africa. *Journal Parasitology*. 91: 863-870.
- TEIXEIRA W.F., COELHO W.M., NUNES C.M., MEURELES M.V. (2011):** Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in calf fecal samples by direct immunofluorescence assay. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*. 20: 269-2373.
- TERRIL T.H., MOSJIDIS J.A., MOORE D.A., SHAIK S.A., MILLER J.E., BURKE J.M., MUIR J.P., WOLFE R. (2007):** Effect of pelleting on efficacy of *Sericea lespedeza* hay as a natural dewormer in goats. *Veterinary Parasitology*. 146: 117-122.
- THIENPONT D., ROCHETTE F., Van PARIJS O.F.J. (1979):** Diagnosing helminthiasis by coprological examination. *Janseen Research Foundation, Beerse*, pp. 187.

- TIZARD I.R. (2009):** Introducción a la inmunología veterinaria. Elsevier, 2009 (8ª ed.) XIV, 574 pp.
- TOLOZA A.C., LUCÍA A., ZERBA E., MASUH H., PICOLLO M.L. (2010):** Eucalyptus essential oil toxicity against permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). Parasitology Research. 106: 409-414.
- TSOTETSI A.M., NJIRO S., KATSANDE T.C., MOYO G., BALOYI F., MPOFU J. (2013):** Prevalence of gastrointestinal helminths and anthelmintic resistance on small-scale farms in Gauteng Province, South Africa. Tropical Animal Health Production. 45: 751-761.
- URIARTE J., LLORENTE M.M., VALDERRÁBANO J. (2003):** Seasonal changes of gastrointestinal nematode burden in sheep under an intensive grazing system. Veterinary Parasitology. 118: 79-92.
- URQUHART G.M., ARMOUR J., DUNCAN J.L., DUNN A.M., JENNINGS F. (2001):** Parasitología Veterinaria. Ed. Acribia.
- VALDERRÁBANOS J., CALVETE C., URIARTE J. (2010):** Effect of feedind bioactive forages on infection and subsequent development of *Haemonchus contortus* in lamb feces. Veterinary Parasitology. 172: 89-94.
- VAN den HAM H.J., ANDEWEG A.C., de BOER R.J. (2013):** Induction of appropriate Th cell phenotypes: Cellular decision-making in heterogeneous environments. Parasite Immunology.
- VAN WYK J.A., BATH G.F. (2002):** The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. Veterinary Research. 33: 509-529.
- VÁRADY M., CÔRBA J. (1999):** Comparison of six *in vitro* in determining benzimidazoles and levamisole resistance in *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* of sheep. Veterinary Parasitology. 80: 239-249.
- VIEIRA L.S., LIMA J.D., ROSA J.S. (1997):** Development of *Eimeria ninakholyakimovae* Yakimoff & Rastegaieff, 1930 emend. Levine 1961 in experimentally infected goats (*Capra circus*). Journal of Parasitology. 83: 1015-1018.
- VLASSOFF A., LEATHWICK D.M., HEATH A.C.G. (2001):** The epidemiology of nematode infections of sheep. New Zealand Veterinary Journal. 49: 213-221.
- WAHAB A.R., SUHAILA ABD H. (2007):** Morphological characterization of *Haemonchus contortus* in goats (*Capra hircus*) and sheep (*Ovis aries*) in Penang, Malaysia. Tropical Biomedicine. 24: 23-27.
- WALLACE D.S., BAIRDEN K., DUNCAN J.L., ECKERSALL P.D., FISHWICK G., GILL M., HOLMES P.H., MCKELLAR Q.A., MURRAY M., PARKINS J.J., STEAR M.J. (1998):** The influence of dietary supplementation with urea on resilience and resistance to infection with *Haemonchus contortus*. Parasitology. 116: 67-72.
- WALLACE D.S., BAIRDEN K., DUNCAN J.L., ECKERSALL P.D., FISHWICK G., HOLMES P.H., MCKELLAR Q.A., MITCHELL S., MURRAY M., PARKINS J.J., STEAR M.J. (1999):** The

influence of increased feeding on the susceptibility of sheep to infection with *Haemonchus contortus*. *Animal Science*. 69: 457-463.

**WALLER P.J., RUDBY-MARTIN L., LJUNGSTRÖM B.L., RYDZIK A. (2004):** The epidemiology of abomasal nematodes of sheep in Sweden, with particular reference to over-winter survival strategies. *Veterinary Parasitology*. 122: 207-220.

**WANG C.R., QIU J.H., ZHU X.Q., HAN X.H., NI H.B., ZHAO J.P., ZHOU Q.M., ZHANG H.W., LUN Z.R. (2006):** Survey of helminths in adult sheep in Heilongjiang Province, People's Republic of China. *Veterinary Parasitology*. 140: 378-382.

**WEDRYCHOWICZ H., HOLMES P.H., BAIRDEN K., TATI A. (1994):** Surface and excretory/secretory antigens of fourth-stage larvae and adult *Ostertagia circumcincta*. *Veterinary Parasitology*. 25: 821-852.

**WILLIAMS D.J., MCGARRY J., GUY F., BARBER J., TREES A.J. (1997):** Novel ELISA for detection Neospora-specific antibodies in cattle. *Veterinary Record*. 140: 328-331.

**WILLIAMS R.B. (1997):** Laboratory tests of phenolic disinfectants as oocysticides against the chicken coccidian *Eimeria tenella*. *Veterinary Record*. 141: 447-448.

**WILLIAMS B., WARREN J. (2004):** Effects of spatial distribution on the decomposition of sheep faeces in different vegetation types. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 103: 237-243.

**WOSTENHOLME A.L., FAIRWEATHER I., PRICHARD R., von SAMSON-HIMMELSTJERNA G., SANGSTER N.C. (2004):** Drug resistance in veterinary helminths. *Trends of Parasitology*. 20: 469-476.

**WRIGHT S.E., COOP R.L. (2007):** Cryptosporidiosis and coccidiosis. In: Aitken ID (ed) *Diseases of sheep*. 4<sup>th</sup> edn. Blackwell Publishing. Oxford, pp 174-185.

**YANG R., JACOBSON C., GARDNER G., CARMICHAEL I., CAMPBELL A.J., RYAN U. (20014):** Longitudinal prevalence, oocyst shedding and molecular characterisation of *Eimeria* species in sheep across four states in Australia. *Experimental parasitology*. 145: 14-21.

**YOU, M. (2014):** Suppression of *Eimeria tenella* sporulation by disinfectants. *Korean Journal of Parasitology*. 52: 435-438.

**ZAINALABIDIN F.A., RAIMY N., YAACOB M.H., MUSBAH A., BATHMANABAN P., ISMAIL E.A., MAMAT Z.C., ZAHARI Z., ISMAIL M.I., PANCHADCHARAM C. (2015):** The prevalence of parasitic infestation of small ruminant farms in Perak, Malaysia. *Tropical Life Sciences Research* 26: 1-8.

**ZAJAC, A.M. (2006):** Gastrointestinal nematodes of small ruminants: life cycle, anthelmintics, and diagnosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 22: 529-541.

**ZARRIN M., RAHDAR M., GHOLAMIAN A. (2015):** Biological control of the nematode infective larvae of *Trichostrongylidae* family with filamentous fungi. *Jundishapur Journal Microbiology*. 8: e17614.

**ZHU L., DAI J.L., YANG L., QIU J. (2013):** *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of the essential oil of *Artemisia lancea* against *Haemonchus contortus* (Strongylida). *Veterinary Parasitology*. 195: 112-117.

