

Potencial de extractos arbóreos en la inhibición de la eclosión y migración larval de *Haemonchus contortus*

Artículo científico

doi: 10.22201/fmvz.24486760e.2023.1258

Edgar Aguilar-Urquizo, Erika Mercedes Marcín-Marrufo, Miguel Ángel Magaña-Magaña, Ángel Trinidad Piñeiro-Vázquez, Juan Felipe de Jesús Torres-Acosta, Mateo Itza-Ortiz

Fechas:

Envío: 2023-08-24

Aceptado: 2023-08-30

Publicado: 2023-10-20

Cómo citar este artículo:

Aguilar-Urquizo E, Marcín-Marrufo EM, Magaña-Magaña MÁ, Piñeiro-Vázquez ÁT, Torres-Acosta JF de J, Itza-Ortiz M. Potencial de extractos arbóreos en la inhibición de la eclosión y migración larval de *Haemonchus contortus*. Veterinaria Mexico OA. 2023;10. doi: 10.22201/fmvz.24486760e.2023.1258

Potencial de extractos arbóreos en la inhibición de la eclosión y migración larval de *Haemonchus contortus*

Resumen

Las parasitosis gastrointestinales constituyen importantes problemas de salud, se agravan con el paso de los años debido al uso inadecuado de medicamentos para su control y provocan resistencia a los antihelmínticos. El objetivo del presente estudio fue evaluar el potencial de los extractos de *Azadirachta indica* (AZA) y *Moringa oleifera* (MOR) para inhibir la eclosión de huevos y la migración *in vitro* de larvas de *Haemonchus contortus*. Se realizó un diseño experimental completamente al azar, donde se evaluaron 15 tratamientos y un control negativo de dimetilsulfóxido: MOR-75, MOR-50, MOR-25, MOR-12.5 y MOR-6.25 mg/mL; AZA-75, AZA-50, AZA-25, AZA-12,5 y AZA-6,25 mg/mL; y tiabendazol (TBZ) TBZ-200, TBZ-100, TBZ-40, TBZ-20, TBZ-10 µg/mL. Los extractos no inhibieron la capacidad de eclosión de los huevos; sin embargo, se observó una disminución de la motilidad de hasta un 100 % en las larvas L₁. Los extractos afectaron la migración larval ($P < 0.0020$) en comparación con los controles (dimetilsulfóxido y TBZ), con una inhibición de la tasa de migración superior al 65 %. El análisis Probit mostró que las concentraciones efectivas medianas fueron 60.41 y 65.69 mg/mL para *M. oleifera* y *A. indica*, respectivamente. Los resultados *in vitro* sugieren que el extracto acuoso

de ambas plantas tiene acción antihelmíntica contra larvas de nematodos gastrointestinales.

Palabras clave: Antihelmíntico; *Azadirachta indica*; *Haemonchus contortus*; *Moringa oleifera*; Ovino.

Contribución al estudio

Las parasitosis gastrointestinales constituyen importantes problemas de salud. Se agravan con el paso de los años debido al uso inadecuado de medicamentos para su control y provocan resistencia a los antihelmínticos. Uno de los principales problemas que afecta a la producción ovina en el sistema de pastoreo es la infestación por nematodos gastrointestinales que afecta a la mayoría de las pequeñas explotaciones de rumiantes a nivel mundial. La parasitosis gastrointestinal tiene un mayor impacto en las regiones tropicales y subtropicales, donde las condiciones ambientales favorecen la proliferación de parásitos. El presente estudio evalúa un problema complejo que se experimenta actualmente con respecto al potencial de los extractos de plantas para inhibir la eclosión de huevos en larvas de nematodos gastrointestinales. En busca de minimizar el uso de productos químicos y de tener una producción ganadera sustentable, así como contribuir con soluciones al problema y ayudar a minimizar el uso de productos químicos.

Introducción

En 2016, la producción ovina en México fue de aproximadamente 118 mil toneladas, de las cuales 60 300 se destinaron a canales de carne de ovino. México solo cubre el 70 % de la demanda nacional, el 30 % restante es importado de Australia, Nueva Zelanda y Estados Unidos de América; por lo que esta producción se considera de gran importancia en el contexto del desarrollo de la industria ganadera, que proporciona alimentos, materias primas, empleo y, lo más importante, ingresos a la población rural. Esta es la población más dedicada a esta actividad.⁽¹⁾ Sin embargo, uno de los principales problemas que afecta a la producción ovina basada en el sistema de pastoreo ha sido la infestación por nemátodos gastrointestinales (NGI), que afecta a la mayoría de las explotaciones ganaderas de pequeños rumiantes, no solo en México, sino en todo el mundo.

La parasitosis gastrointestinal tiene mayor impacto en las regiones tropicales y subtropicales, donde las condiciones ambientales favorecen la proliferación de parásitos^(2, 3) y se considera que tiene un alto impacto económico debido a la disminución del peso corporal de los animales y, por tanto, a una mayor vulnerabilidad a enfermedades con posible aumento de la mortalidad.⁽²⁾ La parasitosis gastrointestinal ha sido un problema de salud a nivel mundial debido al uso inadecuado de parasiticidas fomentando la resistencia a los antihelmínticos (RA).⁽⁴⁾

En algunos países, el parásito de mayor impacto negativo ha sido *Haemonchus contortus*; sin embargo, en los últimos años, también ha tomado importancia *Trichonstrogylus colubriformis*.^(5, 6) Otros géneros que están presentes: *Nematodirus*, *Oesophagostomum*, *Cooperia*, *Strongyloides*, *Teladorsagia*, *Chabertia*, *Bunostomum*, *Trichuris* y *Dictyocaulus*.⁽⁷⁾ Se ha demostrado que los parásitos sanguíneos *Haemonchus contortus* tienen gran impacto negativo en los animales porque pueden generar una disminución sanguínea aproximada de 0.05 mL por nemátodo adulto por día.

Una carga parasitaria de 5 000 nemátodos adultos en un huésped, representa una disminución sanguínea de 250 mL por día en un ovino, lo que provocan anemia, anorexia y problemas de salud; refleja una disminución en los indicadores productivos tales como: ganancia de peso diaria, peso final al sacrificio y peso de la canal, y aumento de la conversión alimenticia, lo que se traduce en ineficiencia económica de los sistemas de pastoreo del ganado, y genera desaliento y abandono de la actividad.^(8, 9)

Para minimizar la RA, se han estudiado varios métodos alternativos con el objetivo de encontrar soluciones al problema de NGI en ovinos, particularmente *Haemonchus contortus*. Uno de los métodos más destacados es el uso de plantas con potencial antihelmíntico que ofrezcan control biológico sin resistencia antihelmíntica para la reducción de larvas gastrointestinales y que se aprovechen

sus metabolitos secundarios como saponinas, taninos y alcaloides, que inhiben la eclosión de los huevos y la migración larval.^(10, 11)

Al respecto, los reportes indican que las hojas de neem (*Azadirachta indica*) producen principios activos efectivos, particularmente contra los endoparásitos.⁽¹²⁾ También se ha reportado que el uso de extracto de *A. indica* inhibe más del 80 % de la eclosión de los huevos e interfiere con el desarrollo de las larvas en más del 70 %.⁽¹³⁾ Por el contrario, se ha informado que el extracto acuoso esterilizado de hojas de moringa (*Moringa oleifera*) tiene un efecto antibacteriano y una acción antifúngica del extracto alcohólico de semilla contra hongos fitopatógenos.^(4, 14)

El uso de extractos acuosos de estas plantas (*A. indica* y *M. oleifera*) en sistemas de producción ovina podría interferir con el desarrollo de larvas de parásitos, por lo que es importante evaluar su potencial impacto positivo. Además, estas alternativas están a disposición de los productores porque son menos costosas que los medicamentos y pueden usarse como suplementos dietéticos para los animales. El presente estudio evaluó la actividad inhibidora de los extractos de *Azadirachta indica* y *Moringa oleifera* sobre la eclosión de huevos y la migración larvaria *in vitro* de *Haemonchus contortus*.

Materiales y métodos

Declaración ética

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética en experimentación animal de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Departamento de Ciencias Veterinarias (Resolución CEI-2023-2-980).

Área de estudio y recolección de hojas de árboles.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Fisiología Digestiva del Instituto Tecnológico de Conkal, ubicado en el km 16.3 de la Carretera Antigua Mérida-Motul, Conkal, México, ubicado a 21°05' N y 89°32' O, con AWO clima subhúmedo a 7 m sobre el nivel del mar, temperatura promedio anual de 26 °C y precipitación anual de 900 mM.⁽¹⁵⁾ Las hojas de *A. indica* y *M. oleifera* se cosecharon durante los meses de abril y mayo, en horario matutino, de áreas experimentales pertenecientes al Instituto.

Recolección de material parasitario

Se utilizó un ovino macho de cuatro meses de edad, con un peso de 20 kg, desparasitado con albendazol e ivermectina. El animal estuvo confinado en una jaula metabólica durante 15 días para adaptación de la dieta (bolitas de alfalfa). Luego de diez días de desparasitación, se recolectaron muestras fecales cada dos días durante una semana para verificar si el ovino se encontraba libre de endoparásitos. Una vez confirmada la ausencia de huevos, larvas y endoparásitos,

especialmente *Haemonchus*, se inoculó al animal por vía oral con una jeringa (Plastipack™, México) de 20 mL. Luego de la inoculación y transcurrido el periodo de prepatencia (28 días), se recolectaron muestras para la obtención de huevos y su uso en el ensayo.

Preparación de extracto acuoso

Las hojas de cada planta se colocaron en una estufa de calentamiento y secado durante 48 h; posteriormente se trituraron utilizando un Molino Wiley (Thomas Scientific, Modelo 8455.6) hasta alcanzar un tamaño de partícula de 0.1 mM. Se prepararon dos soluciones madre utilizando 25 g de material seco (MS) en 200 mL de agua destilada por planta; la solución resultante se agitó a 680 rpm usando un agitador (Thermo Scientific™, Modelo 88880017) hasta la dilución total. Posteriormente se mantuvieron en refrigeración a 4 °C durante 48 h y se filtraron utilizando una gasa y un tamiz con un tamaño de malla de 38 µ. El preparado se etiquetó por planta como solución madre de neem (*A. indica*) y moringa (*M. oleifera*), a partir de las cuales se realizaron diferentes diluciones.⁽¹⁶⁾

Diluciones de extractos acuosos

Cada solución madre se diluyó de la siguiente manera: extracto de moringa a 75, 50, 25, 12.5 y 6.25 mg/mL. Extracto de neem a 75, 50, 25, 12.5 y 6.25 mg/mL. Cinco diluciones de tiabendazol en 200, 100, 40, 20 y 10 µg/mL como control positivo y dimetilsulfóxido (DMSO) como control negativo (D4540-1L SIGMA©).

Ensayo 1

Se utilizó la prueba de eclosión de huevos (PEH), modificada de la técnica descrita por Marie-Magdeleine.⁽¹⁷⁾ La recolección de huevos de *H. contortus* del animal inoculado se dispensó en placas celulares de 24 pocillos (120 a 150 huevos/pocillo y se repitieron tres), y se expusieron a diferentes soluciones de extractos acuosos. Las placas se incubaron durante 48 h. Posteriormente se utilizó un microscopio invertido (WF10x-18 mM, VELAB®) con un poder de aumento de 10x y se contó el número de huevos y larvas para determinar el porcentaje de eclosión utilizando la siguiente ecuación:

Inhibición de eclosión = 100 - eclosión

Donde:

Eclosión = [(larvas L₁) / (huevos + larvas L₁)] × 100

Ensayo 2

La prueba de migración larvaria (PML) se realizó modificando la técnica previamente descrita por Demeler et al. (2010).⁽¹⁷⁾ Las larvas de tercer estadio (L₃) o larvas infecciosas en placas de 24 pocillos obtenidas de coprocultivo se expusieron a diferentes diluciones de extracto acuoso. El contenido del pozo se leyó usando un microscopio invertido (10x). Finalmente, se determinó el número de larvas migradas y se calculó el porcentaje de inhibición de la migración larvaria (IML) mediante la siguiente ecuación:

$$IML = \frac{A - B}{A} \times 100$$

Donde:

A= proporción de larvas migradas en el control

B= proporción de larvas migradas en los tratamientos

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar con tres tratamientos y un control negativo. Los resultados se analizaron utilizando PROC GLM de SAS versión 9.1.3.⁽¹⁸⁾ Se consideró una placa de pocillos como unidad experimental. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey y un nivel alfa de 0.05.⁽¹⁹⁾ Las concentraciones letales (CL_{50, 99}) se calcularon utilizando Probit a través del programa Polo Plus.⁽²⁰⁾

Resultados

Los metabolitos secundarios en las hojas y soluciones madre de *Moringa oleifera* y *Azadiracht indica* se muestran en la Cuadro 1. Con base en el análisis de varianza, los extractos acuosos utilizados no interfirieron ($P = 0.0055$) con la eclosión de los huevos de *Haemonchus contortus*; sin embargo, afectaron la motilidad L₁ entre un 98 y un 100 % ($P = 0.0021$).

Cuadro 1. Análisis químico de las hojas y solución madre para metabolitos secundarios neem (*Azadirachta indica*) y moringa (*Moringa oleifera*) (g/100 g)

Análisis	Planta	Taninos condensados	Taninos totales	Fenoles totales
Hojas	Neem	1.00	0.46	1.84
	Moringa	1.07	0.47	1.78
Solución	Neem	0.25	0.115	0.46
Madre (25 g of DM)	Moringa	0.27	0.117	0.44

En el análisis también se observó que los extractos acuosos de MOR (90.17 %) y AZA (89.70 %), y el control negativo DMSO (95.65 %) no tuvieron efecto sobre la eclosión de huevos de *H. contortus*; sin embargo, en el grupo TBZ (38.81), la eclosión de los huevos se inhibió significativamente ($P = 0.0025$) cuando se

expusieron a las diferentes concentraciones (Cuadro 2), lo que ratifica el efecto ovicida de este fármaco.

Cuadro 2. Huevos y larvas de *Haemonchus contortus* con base en el tratamiento con extracto acuoso de plantas (media \pm DE)

Tratamiento	Huevos	Larvas L ₁
Dimetilsulfoxido (DMSO)	6.13 \pm 4.14 ^a	109.58 \pm 6.42 ^a
Neem (<i>Azadirachta indica</i>)	8.11 \pm 4.47 ^b	105.05 \pm 7.26 ^b
Moringa (<i>Moringa oleifera</i>)	7.80 \pm 4.47 ^b	105.40 \pm 7.50 ^b
Tiabendazol	36.21 \pm 30.81 ^c	76.02 \pm 31.35 ^c

a, b, c, d= literales diferentes en la misma columna indican diferencias (P < 0.05).

Los extractos acuosos de AZA y MOR en cada dilución no tuvieron efecto significativo (P = 0.0055) sobre la eclosión de huevos de *H. contortus*. Por el contrario, se observó una respuesta dosis-dependiente a TBZ (P = 0.0010) (Figura 1).

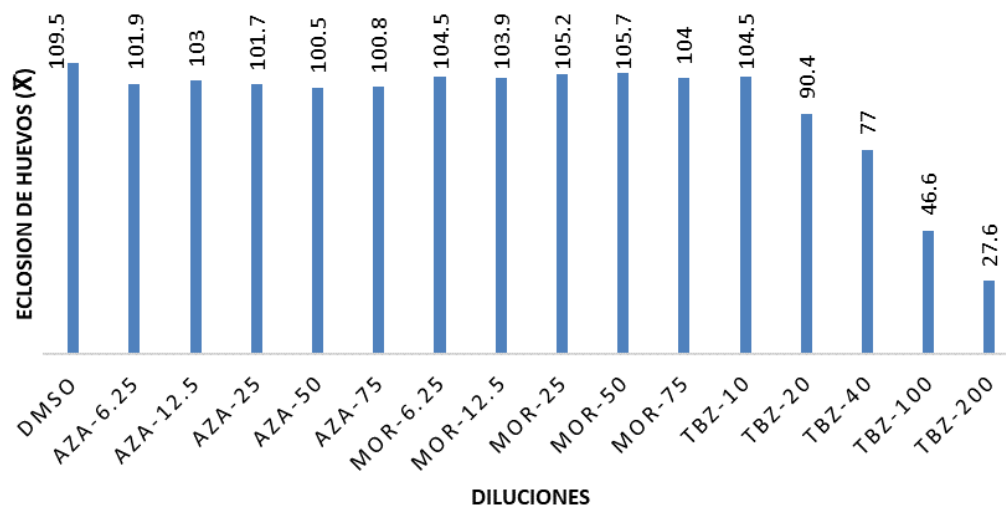


Figura 1. Media de eclosión de huevos en diferentes extractos de *Azadirachta indica* (AZA), *Moringa oleífera* (MOR), tiabendazol (TBZ) y dimetilsulfóxido (DMSO) como control negativo.

Se observó que los extractos acuosos de MOR y AZA inhibieron más del 95 % (L₁) de la motilidad larvaria de primer estadio. La respuesta de L₁ a ambas plantas no fue típica de una reacción dosis-dependiente porque la concentración más baja logró el porcentaje de motilidad más bajo (Figura 2).

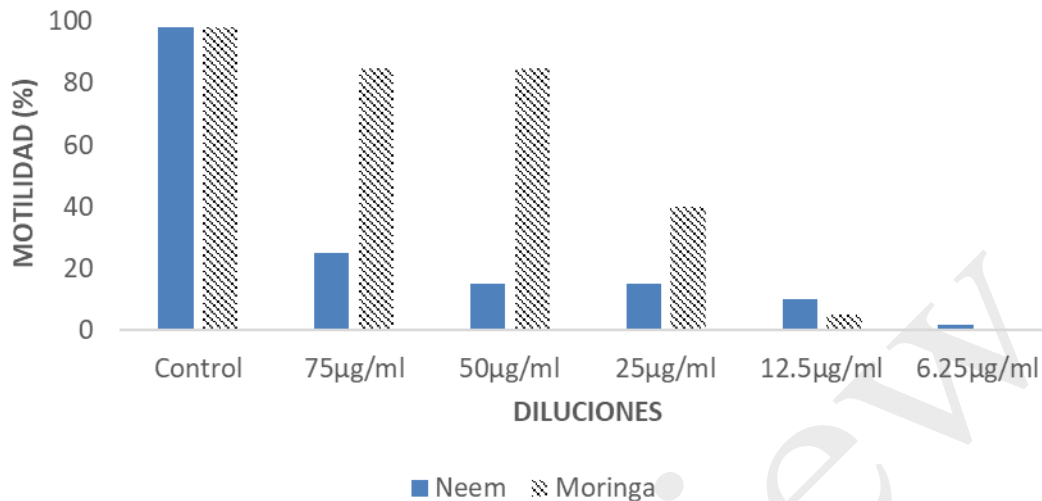


Figura 2. Motilidad de la larva (L₁) expuesta a diferentes concentraciones de extractos acuosos de *Azadirachta indica* y *Moringa oleifera*.

Mientras que la migración de larvas de primera etapa (L₁) disminuyó ($P = 0.0031$), las diluciones de extractos acuosos de las plantas aumentaron (Cuadro 3 y Figura 3).

Cuadro 3. Larvas L₃ de *Haemonchus contortus* que migraron y no migraron cuando fueron expuestas a diferentes concentraciones de extractos acuodos de neem y moringa

Tratamiento	Dilución	Migración	No migración
Neem	0	127.9 ± 9.9 ^a	26.5 ± 8.7 ^e
Neem	6.2	93.1 ± 14.1 ^b	59.7 ± 14.0 ^d
Neem	12.5	85.3 ± 17.1 ^{bc}	66.4 ± 18.4 ^{cd}
Neem	25	74.1 ± 14.5 ^d	79.3 ± 16.1 ^b
Neem	50	58.4 ± 7.7 ^e	94.0 ± 8.7 ^a
Neem	75	49.7 ± 8.6 ^e	102.4 ± 11.2 ^a
Moringa	0	126.4 ± 9.2 ^a	28.0 ± 9.9 ^e
Moringa	6.2	91.9 ± 14.8 ^b	61.5 ± 13.8 ^d
Moringa	12	88.0 ± 16.5 ^b	64.2 ± 17.0 ^d
Moringa	25	76.5 ± 14.2 ^{cd}	75.0 ± 15.1 ^{bc}
Moringa	50	67.9 ± 18.6 ^d	84.5 ± 18.0 ^b
Moringa	75	53.0 ± 21.6 ^e	99.2 ± 22.7 ^a

a, b, c, d, e= literales diferentes en la misma columna indican diferencias (P < 0.05).

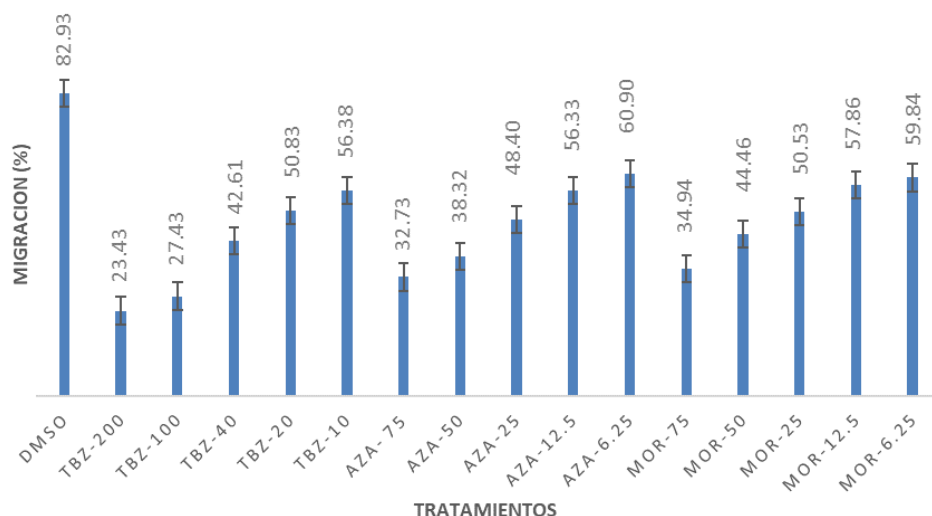


Figura 3. Porcentaje de migración larval (L₃) de *Haemonchus contortus* en ovinos expuestos a extractos acuosos de *Azadirachta indica* (AZA), *Moringa oleifera* (MOR), tiabendazol (TBZ), y dimetilsulfóxido como control negativo (DMSO).

Discusión

En este estudio, no se observó la inhibición de la eclosión de los huevos cuando los huevos de *H. contortus* fueron expuestos a extractos acuosos de *A. indica* y *M. oleifera*, pero se observó que desde la eclosión hasta L₁, existe un efecto directo de los extractos, interferir con la capacidad de motilidad del parásito; esto es posible porque las larvas ingieren el extracto que contiene metabolitos, como taninos y fenoles, dañando su intestino, que representa el 80 % del parásito,⁽²¹⁾ y mostrando así actividad inhibidora de los extractos.⁽²²⁻²⁵⁾ En un estudio realizado por Costa,⁽²⁶⁾ donde se utilizó extracto etanólico de *A. indica* en dosis bajas (3.12 mg/mL),

lograron hasta un 97.7 % de inhibición del huevo de *H. contortus* y consideraron que posiblemente la acción ovicida esté asociada a otros compuestos secundarios, tales como triterpenoides y taninos condensados. Un resultado similar se demostró en este estudio, donde se utilizó una dosis baja (6.25 mg/mL) de extracto de *A. indica* y *M. oleífera*, y se obtuvo un porcentaje bajo (2 %) de larvas móviles (L₁).

En este sentido, la prueba *in vitro* implicó el uso de extractos acuosos para determinar la eclosión de huevos y la migración de las larvas, donde ambas plantas (neem y moringa) no tuvieron una respuesta típica porque no inhibieron la eclosión de los huevos, contrario a lo que sucedió en la migración de las larvas, debido a la presencia de principios activos que interfirieron en la motilidad de la larva (L₁), incapacitando al parásito para que pudiera migrar a la parte foliar de los pastos y tener capacidad infectiva.

Asimismo, estudios realizados en Brasil⁽¹²⁾ demostraron que el uso de extractos acuosos de hojas secas de neem en una concentración de 240 000 ppm, interfirió en un 89 % la capacidad de eclosión de huevos en cultivos de heces; sin diferenciar entre *H. contortus* o *T. columbriformis*. Atribuyen estos efectos a la presencia de azadiractina. La ventaja de los ensayos *in vitro* es que es posible trabajar simultáneamente en diferentes etapas del desarrollo del parásito, tales como validación de huevos antes de la eclosión, desarrollo larvario, muda y migración de cutículas con parásitos adultos, sin interferir con las funciones fisiológicas de los huéspedes.⁽²⁷⁾

En la prueba de migración larvaria, los resultados mostraron que cinco concentraciones diferentes de extracto tuvieron efectos inhibidores sobre la motilidad de las larvas L₁ (Figura 3). Este estudio mostró que el DMSO no interfirió con (P = 0.0010) la capacidad de migración de las larvas infecciosas L₃, mientras que el tiabendazol migró (P = 0.0010). Este fármaco implica una interacción con la tubulina que mejora la formación de microtúbulos, que intervienen en la fisiología y morfología celular; así, los bencimidazoles se unen a la tubulina, impidiendo la formación de estos microtúbulos y alterando el metabolismo de los parásitos al inhibir el metabolismo a nivel mitocondrial, impidiendo la formación de ATP y provocando la muerte del parásito.⁽²⁸⁾

Es importante resaltar la capacidad de los extractos acuosos de *A. indica* y *M. oleifera* para inhibir significativamente (P = 0.0020) la migración larvaria (Cuadro 3). El efecto inhibitor sobre la capacidad de migración larvaria se atribuye a los metabolitos secundarios con propiedades antihelmínticas, como los taninos condensados,⁽²⁹⁾ lectinas,⁽³⁰⁾ terpenoides,⁽³¹⁾ flavonoides,⁽³²⁾ y a la afinidad de compuestos fenólicos o taninos por las glicoproteínas (prolina) de la cutícula del parásito a la que se une, lo que inhibe la motilidad, el desarrollo larval, la alimentación, la reproducción y finalmente la muerte, o la acción membranolítica de las saponinas, entre otras.⁽³³⁻³⁵⁾

En este estudio se demostró el alto poder de inhibición (> 60 %) de la migración de larvas de *H. contortus*, lo que puede atribuirse a los compuestos

secundarios de las plantas evaluadas. Aunque queda por determinarse su totalidad y concentración. Moreno⁽³⁶⁾ evaluó el efecto *in vitro* de hojas secas sobre la migración de larvas infectantes L₃ de *Haemonchus contortus*, *Cooperia* sp., *Haemonchus placei* y *Trichostrongylus columbriformis*. *Callitris endlicheri* inhibió consistentemente la migración de los nemátodos estudiados. Las especies de nemátodos de *H. contortus* presentan un porcentaje de inhibición de la migración larvaria de 88 a 89.83 %, con una dosis de 5 y 30 mg/mL, respectivamente. Estos estudios *in vitro* sugieren la existencia de propiedades antihelmínticas en algunas de las especies vegetales estudiadas.

Al igual que en este estudio, donde los extractos acuosos de *A. indica* y *M. oleifera* tuvieron un efecto sobre la inhibición de la migración larvaria de *H. contortus*, otros estudios reportaron que son plantas versátiles, que han mostrado resultados interesantes en el control integrado de plagas de cultivos en el sector ganadero.^(37, 38) Existen estudios específicos que reportan actividad nematocida de las plantas,^(12, 27) donde la inhibición de la migración larvaria es del 95 % cuando se utilizan extractos acuosos de *Gliricida sepium*.⁽³⁹⁾ *M. oleifera* presentó un tamizaje fitoquímico de alcaloides, glucósidos, flavonoides, esteroides, terpenoides, saponinas, taninos y antraquinonas.⁽⁴⁰⁾ Mientras, *A. indica* es una planta con numerosos terpénicos (diterpenos) y más de cincuenta tetranortriterpenoides: azadiractina, nimbolida, ácido nímico, azadirona, nimbina, etc.

La más interesante es la azadiractina, que se comporta como antinutriente para insectos, bacterias y nemátodos.⁽⁴¹⁾ Otros estudios han utilizado *Gliricida sepium*, una planta con gran variedad de efectos secundarios. Los metabolitos, como saponinas, taninos y alcaloides,⁽⁴²⁾ así como entre 3.6–4.6 % de las concentraciones de taninos condensados.⁽⁴³⁾ Estas diferencias en la capacidad ovicida y la inhibición de la migración larval en diferentes estudios *in vitro* pueden estar asociadas con el origen del material vegetal.

La composición química de una planta puede variar considerablemente entre plantas de una misma especie debido a diferencias genéticas y ambientales, el estado fenológico, los procesos de cosecha, el método de secado de la muestra, la técnica de extracción, entre otros.⁽⁴⁴⁾ En este sentido, es necesario un control estricto. Se recomienda la calidad del material a evaluar.⁽⁴⁵⁾

En general, los tipos de soluciones y métodos de extracción pueden afectar en gran medida la actividad de los compuestos botánicos, como se observa con los extractos hidroalcohólicos, que contienen algunas sustancias químicas orgánicas no polares con mayor polaridad que los extractos acuosos y tienen mayor solubilidad en el contenido lipídico.⁽⁴⁶⁾

Conclusiones

Los extractos acuosos de *Azadirachta indica* y *Moringa oleifera* no afectaron la eclosión de huevos de *Haemonchus contortus*. Sin embargo, a medida que las larvas se desarrollaron hasta L₁, la motilidad disminuyó del 98 al 100 % utilizando la

concentración más baja de ambos extractos. En cuanto a la migración larvaria, ambos extractos tuvieron efectos nocivos sobre las larvas infectantes (L₃) con una tasa de inhibición del 67 por ciento.

Early View

Agradecimientos

Un agradecimiento especial a M.Sc. Fany Cen Chuc, Asistente del Laboratorio de Fisiología Digestiva, por su apoyo con los análisis de laboratorio y la asesoría en la realización de esta investigación.

Declaración de financiamiento

El apoyo financiero fue proporcionado por la Dirección General de Educación Superior Tecnológica (DGEST) para el desarrollo de esta investigación (5307.14-P).

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Contribuciones de autor

Conceptualización: E Aguilar-Urquizo.

Análisis: JFJ Torres-Acosta, E Aguilar-Urquizo.

Investigación: E Marcín-Marrufo.

Metodología: JFJ Torres-Acosta, E Aguilar-Urquizo.

Supervisión: M Magaña-Magaña, AT Piñeiro-Vázquez, E Aguilar-Urquiso.

Validación: JFJ Torres-Acosta, E Aguilar-Urquizo.

Borrador original: E Marcín-Marrufo.

Revisión del documento y edición: M Itza-Ortiz, E Aguilar-Urquizo.

Referencias

1. SAGARPA. La ovinocultura, una actividad muy arropadora. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2017. <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/la-ovincultura-una-actividad-muy-arropadora>
2. Torres-Acosta JFJ, Hoste H. Alternative or improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Ruminant Research*. 2008;77:159-173. doi: 10.1016/j.smallrumres.2008.03.009.
3. Arece J, Rodríguez JG. Dinámica de las larvas infestantes de strongílidos gastrointestinales en ovinos en pastoreo. *Pastos y Forrajes*. 2010;33(1):1–17.
4. Gilleard JS. Understanding anthelmintic resistance: the need for genomics and genetics. *International Journal for Parasitology*. 2006;36: 1227–1239. doi: 10.1016/j.ijpara.2006.06.010.
5. Rojas N, Arias M, Arece J, Carrión M, Pérez K, Valerino P. Identificación de *Trichostrongylus colubriformis* y *Oesophagostomun columbianum* en caprinos del valle del Cauto en Granma. *Revista Salud Animal*. 2011;33(2):116-120.
6. López-Ruvacalba OA, González GR, Osorio AMM, Aranda IE, Díaz RP. Cargas y especies prevalentes de nematodos gastrointestinales en ovinos de pelo destinados al abasto. *Revista Mexicana Ciencias Pecuarias*. 2013;4(2):223–234.

7. Naem S, Gorgani T. Gastrointestinal parasitic infection of slaughtered sheep (Zel breed) in Fereidoonkenar city, Iran. *Veterinary Research Forum*, 2011;2(4):238–241.
8. Cordero M, Rojo FA. *Parasitología Veterinaria*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 1999.
9. Fthenakis GC, Papadopoulos E. Impact of parasitism in goat productions. *Small Ruminant Research*. 2018;163:21–23. doi: 10.1016/j.smallrumres.2017.04.001.
10. Larsen M. Biological control of nematode parasites in sheep. *Journal of Animal Science*. 2006;84:133. doi: 10.2527/2006.8413_supple133x.
11. Marie-Magdeleine C, Mahieu M, D'Alexis S, Philibert L, Archimede H. *In vitro* effects of *Tabernaemontana citrifolia* extracts on *Haemonchus contortus*. *Research Veterinary Science*. 2010;89(1):88–92. doi: 10.1016/j.rvsc.2010.01.002.
12. Chagas AC, Vieira L. Ação de *Azadirachta indica* (Neem) em nematódeos gastrintestinais de caprinos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2007;44(1):49–55. doi: 10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2007.26661.
13. Barrabí-Puerta M, Arece-García J. Actividad antihelmíntica *in vitro* de extracto acuoso de hojas y semillas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss), I. Inhibición de la eclosión y del desarrollo larvario. *Revista de Salud Animal*. 2013;35(2):103–108.

14. Mughal MH, Ali G, Srivastava PS, Iqbal M. Improvement of drumstick (*Moringa pterygosperma Gaertn*) a unique source of food and medicine through tissue culture. *Hamdard Medicus*. 1999;42:37–42.
15. Flores JS, Espejel I. Tipos de vegetación de la Península de Yucatán. *Etnoflora Yucatanense, Fascículo 3*. Mérida, México: Universidad Autónoma de Yucatán; 1994.
16. Valderrabano J, Uriarte J. Efecto ovicida y larvicida de ciertos extractos vegetales, ITEA. *IX Jornadas sobre Producción Animal*. 2001;22(1):179–181.
17. Demeler J, Kuttler U, Samson-Himmelstjerna G. Adaptation and evaluation of three different *in vitro* tests for the detection of resistance to anthelmintics in gastrointestinal nematodes of cattle. *Veterinary Parasitology*. 2010;170:61–70. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.01.032.
18. SAS. *SAS/STAT User's guide (Version 9.1.3)*. Cary, NC: SAS Institute Inc; 2013.
19. Mendenhall WRJ. Introduction to linear model and the design and analysis of experiments. In: W Mendenhall, editor. *Introduction to Probability and Statistics*. Belmont, Duxbury: Brooks/Cole, Cengage Learning; 1994; 244–251.
20. LeOra-Software. Polo Plus Free. 2004. <https://immense-ravine-20905.herokuapp.com/Leora-Software-Polo-Plus-Free-Do.pdf>
21. Lee D. *The Biology of Nematodes*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press; 2002. pp. 1–60.

22. Kamaraj C, Rahuman AA. Efficacy of anthelmintic properties of medicinal plant extracts against *Haemonchus contortus*. *Research in Veterinary Science*. 2011;91(3):400–404. doi: 10.1016/j.rvsc.2010.09.018.
23. Carvalho CO, Chagas ACS, Cotinguiba F, Furlan M, Brito LG, Chaves FCM, Stephan MP, Bizzo HR, Amarante AFT. The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. *Veterinary Parasitology*. 2012;183(3-4):260–268. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.07.051.
24. Rajagopal PL, Premaletha K, Kiron SS, Sreejith KR. Phytochemical and pharmacological review on *Cassia fistula* Linn. “The Golden Shower”. *International Journal of Pharmaceutical Chemical & Biological Sciences*. 2013;3(3):672–679.
25. Hernández-Alvarado J, Zaragoza-Bastida A, López-Rodríguez G, Peláez-Acero A, Olmedo-Juárez A, Rivero-Perez N. Actividad antibacteriana y sobre nematodos gastrointestinales de metabolitos secundarios vegetales: enfoque en Medicina Veterinaria. *Abanico Veterinario*. 2018;8:14–27. doi: 10.21929/abavet2018.81.1.
26. Costa CTC, Bevilaqua CML, Camurça-Vasconcelos AL, Maciel MV, Morais SM, Castor CMS, Braga RR, Oliveira LMB. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of *Azadirachta indica* extracts on *Haemonchus contortus*. *Small Ruminant Research*. 2008;74:284–287. doi: 10.1016/j.smallrumres.2007.09.003.

27. Githiori JB, Athanasiadou S, Thamsborg SM. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Veterinary Parasitology*. 2006;139(4):308–320. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.04.021.
28. Lubega GW, Prichard RK. Interaction of benzimidazole anthelmintics with *Haemonchus contortus* tubulin: binding affinity and anthelmintic efficacy. *Experimental Parasitology*. 1991;73(2):203–13. doi: 10.1016/0014-4894(91)90023-p.
29. Nguyen TM, Binh DV, Kyle DJ. Effect of foliages containing condensed tannins on gastrointestinal parasites. *Animal Feed Science and Technology*. 2005;121:77–87. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2005.02.013.
30. Ríos de Álvarez L, Jackson F, Greer A, Bartley Y, Bartley DJ, Grant G, Huntley JF. *In vitro* screening of plant lectins and tropical plant extracts for anthelmintic properties. *Veterinary Parasitology*. 2012;186(3-4):390–398. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.11.004.
31. Molan AL, Meagher LP, Spencer PA, Sivakumaran S. Effect of flavan-3-ols on *in vitro* egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. *International Journal for Parasitology*. 2003;33(14):1691–1698. doi: 10.1016/s0020-7519(03)00207-8.
32. Ademola IO, Akanbi AI, Idowu SO. Comparative nematocidal activity of chromatographic fractions of *Leucaena leucocephala*. Seed against

- gastrointestinal sheep nematodes. *Pharmaceutical Biology*. 2005;43(7):599–604. doi: 10.1080/13880200500301761.
33. Alonso-Díaz MA, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Aguilar Caballero AJ, Hoste H. *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* exposed to four tropical tanniferous plant extracts. *Veterinary Parasitology*. 2008;153:313–319. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.01.042.
34. Rodríguez-Molano CE, Cely-Reatiga Y, Gómez-Lara DF. Efecto *in vitro* del extracto de *Lotus corniculatus* L. sobre nemátodos gastrointestinales bovinos. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2016;21(2):145–156.
35. Zaragoza-Bastida A, Rodríguez-Salazar E, Valladares-Carranza B, Rivas-Jacobo M, Herrera-Corredor A, Rivero-Perez N. *Cassia fistula* como tratamiento alternativo contra nematodos gastrointestinales de ovino. *Abanico Veterinario*. 2019;9:1–10. doi: 10.21929/abavet2019.92.
36. Moreno FC, Gordon IJ, Wright AD, Benvenuti MA, Saumell CA. Efecto antihelmíntico *in vitro* de extractos de plantas sobre larvas infectantes de nematodos gastrointestinales de rumiantes. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 2010;42(3):155–163. doi: 10.4067/S0301-732X2010000300006.
37. Giglioti R, Forim MR, Oliveira HN, Chagas ACS, Ferrezini J, Brito LG, Falcoski TORS, Albuquerque LG, Oliveira MCS. *In vitro* acaricidal activity of neem (*Azadirachta indica*) seed extracts with known azadirachtin concentrations

- against *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*. 2011;181(2-4):309–315. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.03.053.
38. Ahmad N, Ansari MS, Hasan F. Effects of neem based insecticides on *Plutella xylostella* (Linn.). *Crop Protection*. 2012;34:18–24.
doi: 10.1016/j.cropro.2011.12.010.
39. Puerto-Abreu M, Arece-García J, López-Leyva Y, Roche Y, Molina M, Sanavria A, da Fonseca AH. Efecto *in vitro* de extractos acuosos de *Moringa oleifera* y *Gliricida sepium* en el desarrollo de las fases exógenas de estrogilidos gastrointestinales de ovinos. *Revista de Salud Animal*. 2014;36(1):28–34.
40. Sinha SN. Phytochemical analysis and antibacterial potential of *Moringa oleifera* Lam. *International Journal of Science Innovations and Discoveries*. 2012;2(4):401–407.
41. INIFAP. El árbol de nim establecimiento y aprovechamiento en la huasteca potosina. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Noreste. Folleto técnico Num. 3. San Luis Potosí, SLP, México; 2004.
42. García DE, Medina MG. Composición química, metabolitos secundarios, valor nutritivo y aceptabilidad relativa de diez árboles forrajeros. *Zootecnia Tropical*. 2006;24(3):233–250.

43. Romero-Lara CE, Palma-García JM, López J. Influencia del pastoreo en la concentración de fenoles totales y taninos condensados en *Gliricidia sepium* en el trópico seco. *Livestock Research for Rural Development*. 2000;12(34).
44. Cromm EM. Documenting and evaluating herbal remedies. *Economy Botany*. 1983;37(1):13–27. doi: 10.1007/BF02859302.
45. Hördegen P, Hertzberg J, Heilmann J, Langhansd W, Maurera V. The anthelmintic efficacy of five plant products against gastrointestinal trichostrongylids in artificially infected lambs. *Veterinary Parasitology*. 2003;117(1-2):51–60. doi: 10.1016/j.vetpar.2003.07.027.
46. Eguale T, Tilahun G, Debella A, Feleke A, Makonnen E. *In vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of crude extracts of *Coriandrum sativum* against *Haemonchus contirtus*. *Journal of Ethanopharmacology*. 2007;110(3):428–33. doi: 10.1016/j.jep.2006.1.