



EFFECTO ANTIHELMÍNTICO *in vitro* E *in vivo* DE RESIDUOS DE *Coffea arabica* SOBRE UN AISLADO DE *Haemonchus contortus* CON BAJA SUSCEPTIBILIDAD A TANINOS

[*In vitro* AND *in vivo* ANTHELMINTIC EFFECT OF *Coffea arabica* RESIDUES AGAINST AN *Haemonchus contortus* ISOLATE WITH LOW SUSCEPTIBILITY TO TANNINS]

G.I. Ortiz-Ocampo^{1*}, J.I. Chan Pérez, A.G. Covarrubias-Cárdenas, R.H. Santos-Ricalde¹, C.A. Sandoval-Castro¹, H. Hoste², C.M. Capetillo-Leal¹, P.G. González-Pech¹ and J.F.J. Torres-Acosta¹

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, CCBA. Universidad Autónoma de Yucatán, Km 15.5 Carretera Mérida-Xmatkuil, Mérida, Yucatán, México. Emails: guadalupeortiz19@gmail.com, carlos.sandoval@correo.uady.mx, tacosta@correo.uady.mx

²UMR 1225 INRA/DGER IHAP, ENVT, 23 Chemin des Capelles, F31076 Toulouse, France.

*Corresponding author

RESUMEN

El presente estudio evaluó el efecto antihelmíntico (AH) *in vitro* e *in vivo* del subproducto percolado de *Coffea arabica* contra un aislado de *Haemonchus contortus* con baja susceptibilidad a taninos. Se evaluó la baja susceptibilidad hacia los taninos del aislado Paraíso (*H. contortus*) con la prueba *in vitro* de inhibición del desenvaine larvario (IDL) utilizando un extracto acetona:agua (70:30) de *Acacia pennatula*. Posteriormente, se evaluó el efecto AH *in vitro* de los extractos acetona:agua del subproducto percolado de *C. arabica* (Clean and Smooth (CS) y Shade Grown (SG) Starbucks®). Seguidamente se determinó el efecto AH *in vivo* en ovinos en crecimiento, (4 meses de edad y 15.2 kg peso vivo) infectados con *H. contortus* (aislado Paraíso) y alimentados con una dieta que contenía el subproducto percolado de *C. arabica*. Se formaron tres grupos experimentales (n = 6 ovinos): Grupo GC (dieta control sin *C. arabica*), grupo GCA (alimento con 10% de *C. arabica*) y el grupo GCA+PEG (polietilenglicol) (alimento con 10% de *C. arabica* + PEG como inhibidor de taninos). Diariamente se obtuvieron muestras de heces del recto de los corderos (días 1 al 20 del estudio). El aislado de *H. contortus* toleró el extracto de *A. pennatula* en las concentraciones de 150 y 300 µg de extracto/ml PBS ($P > 0.05$), lo que confirmó su baja susceptibilidad hacia los taninos. El extracto de *C. arabica* CS redujo el desenvaine desde 150 µg de extracto/ml PBS y el extracto de la variedad SG solo desde 1200 µg de extracto/ml PBS ($P < 0.05$). El consumo del subproducto percolado de *C. arabica* no redujo la excreción fecal de huevos de *H. contortus* (como

huevos por gramo de heces o huevos totales en heces) ($P > 0.05$). Se concluye que el extracto acetónico del subproducto percolado de *C. arabica* posee un efecto AH *in vitro*. Sin embargo, el consumo de alimento conteniendo 10% del subproducto no produjo un efecto AH *in vivo* en ovinos infectados con el aislado Paraíso de *H. contortus*. La ausencia del efecto AH *in vivo* se pudo deber a la baja susceptibilidad hacia los compuestos secundarios de plantas ricas en taninos del aislado de *H. contortus* usado.

Palabras clave: *Haemonchus contortus*; *Coffea arabica*; antihelmíntico; subproducto agroindustrial; susceptibilidad.

SUMMARY

The present study evaluated *in vitro* and *in vivo* anthelmintic (AH) effect of the percolated by-product of *Coffea arabica* against a *Haemonchus contortus* isolate with low susceptibility to tannins. Firstly, the susceptibility to tannins of Paraíso *H. contortus* isolate was evaluated with the *in vitro* larval exsheathment inhibition assay (LEIA) using an acetone:water (70:30) extract of *Acacia pennatula*. Afterwards, the *in vitro* AH effect of acetone:water extracts of percolated *C. arabica* by-products (Clean and Smooth (CS) and Shade Grown (SG) Starbucks®) were evaluated. Then, the *in vivo* AH effect was determined in growing sheep (4 months old and 15.2 kg bodyweight), infected with *H. contortus* (Paraíso isolate) and fed with a diet containing the percolated by-product of *C. arabica*. Three experimental groups were formed (n = 6 lambs): GC Group (control diet without *C. arabica*), GCA Group (feed containing

10% *C. arabica*) and, GCA+PEG (polyethilenglycol) Group (feed with 10% *C. arabica* + PEG as a tannin inhibitor). Fecal samples were obtained daily from the rectum of lambs (days 1 to 20 of the study). The *H. contortus* isolate tolerated the *A. pennatula* extract at concentrations of 150 and 300 µg extract/ml PBS ($P > 0.05$), which confirmed its low susceptibility to tannins. The *C. arabica* CS extract reduced the exsheathment from 150 µg of extract/ml PBS and the SG variety from 1200 µg of extract/ml PBS ($P < 0.05$). The consumption of the *C. arabica* percolated by-product did not reduce the egg excretion of *H. contortus* (either per gram of feces or total eggs in feces) ($P > 0.05$). In conclusion, the *C. arabica*

percolated by-product extracts showed *in vitro* AH effect against exsheathment. However, the consumption of feed containing 10% of the percolated by-product did not show an *in vivo* AH effect in sheep infected with the Paraiso *H. contortus* isolate. The latter could be due to the low susceptibility towards the secondary compounds of tannin rich plants of the *H. contortus* isolate used in this study.

Keywords: *Haemonchus contortus*; *Coffea Arabica*; anthelmintic; by-product; susceptibility; tannin rich extracts.

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de métodos alternativos de control de nematodos gastrointestinales (NGI) en pequeños rumiantes ha sido motivada por la creciente prevalencia de NGI resistentes a los principales antihelmínticos comerciales disponibles en el mercado (Jabbar et al., 2006). Esta situación ha redefinido las prácticas para el control de parásitos, y en este contexto se están desarrollando nuevas estrategias (Torres-Acosta et al., 2012; Kaplan y Vidyashankar, 2012). Entre las estrategias exploradas se encuentra el uso de plantas con metabolitos secundarios, en especial las plantas ricas en compuestos polifenólicos como los taninos condensados (TC) (Hoste et al., 2006; Brunet et al., 2008; Sandoval-Castro et al., 2012).

La selva baja caducifolia del sureste de México (península de Yucatán) presenta una gran diversidad de plantas ricas en taninos (PRT). En Yucatán, estas plantas forman parte importante de la dieta de cabras y ovejas en los sistemas que emplean el agostadero nativo (González-Pech et al., 2014, 2015). Diversos estudios han evaluado el efecto antihelmíntico (AH) *in vitro* de los extractos acetónicos del follaje de PRT de esta región contra larvas infectantes de aislados de *Haemonchus contortus* provenientes del centro de México y Francia (Alonso-Díaz et al., 2008; Vargas-Magaña, 2013; Chan-Pérez et al., 2016). Estos estudios demostraron que los extractos son capaces de interferir en la eclosión, motilidad y el proceso de desenvaine de *H. contortus* expuestos a los extractos. Sin embargo, Calderón-Quintal et al. (2010) encontraron que existe variabilidad en la susceptibilidad a los extractos de PRT en las larvas de diferentes aislados de *H. contortus* provenientes de la región centro de México (CENID y FESC) y los aislados provenientes de ovinos o caprinos pastoreando PRT del agostadero nativo de Yucatán (UADY) o Paraiso (Chan-Pérez et al., datos no publicados). Estos resultados sugieren una posible

plasticidad fenotípica de los NGI contra los compuestos de las PRT debido a la constante exposición con los taninos del follaje consumido por los animales (González-Pech et al., 2015). Se desconoce si la menor susceptibilidad a taninos y otros compuestos secundarios por parte de *H. contortus* (plasticidad fenotípica) es exclusiva de los compuestos secundarios y taninos provenientes del follaje de las PRT o si pudiera incluir a aquellos taninos de fuentes no convencionales, que normalmente no son consumidas por los animales.

Un estudio realizado con caprinos infectados con *H. contortus* (aislado Yucatán) mostró que el consumo de un alimento que contiene el subproducto percolado de *C. arabica* ocasiona un efecto AH evidente (menor fecundidad y tamaño de las hembras de *H. contortus*) (Palomo-Couoh, 2012). Otro estudio realizado con ovinos mostró que el consumo del subproducto percolado de *C. arabica* reduce la fecundidad de un aislado de *H. contortus* susceptible a taninos (Covarrubias-Cárdenas, 2013). El efecto AH en el estudio de los caprinos (aislado de Yucatán) fue más evidente que el encontrado en ovinos (aislado de otra latitud). Esta diferencia pudiera deberse a que las cabras consumieron más subproducto de *C. arábica* que los ovinos en el segundo estudio. Queda por explorar si se podrá identificar algún efecto AH *in vivo* en ovinos infectados con un aislado de *H. contortus* de Yucatán, como es el caso del aislado Paraiso. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto antihelmíntico (AH) *in vitro* e *in vivo* del subproducto percolado de *C. arabica* sobre un aislado de *H. contortus* con baja susceptibilidad a taninos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

El estudio se realizó en el Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad

Autónoma de Yucatán (CCBA-UADY) en Mérida, Yucatán, México. El clima de la región es cálido subhúmedo con lluvias en verano AW₀, con un rango de temperatura mensual máxima entre 35°C y 40°C (promedio de 26.6 °C). La humedad relativa varía entre 65 y 100% (promedio de 80%) y precipitación anual promedio es de 1,092 mm (García, 1988).

Evaluación *in vitro*

Extractos empleados. En éste estudio se emplearon extractos acetona:agua (70:30) de *Acacia pennatula* y *C. arabica* [Shade grown (SG) y Clean smooth (CS)]. Primeramente se colectaron 500 g de follaje fresco de *A. pennatula* y del subproducto percolado de *C. arabica*. Cada extracto se obtuvo con una solución de acetona:agua (70:30 v/v) y ácido ascórbico (3 g/l). El extracto fue filtrado y mezclado con diclorometano (1:1 v/v) para eliminar clorofila y lípidos. Se removió la acetona por rotoevaporación asistida por vacío. Por último cada extracto fue liofilizado. La cantidad de fenoles totales (FT) y taninos condensados (TC) fueron determinados mediante las técnicas de Folin-Ciocalteu (Makkar, 2003) y vanilina (Price et al., 1977) respectivamente. El contenido más alto de FT y TC lo presentó el extracto de *A. pennatula* (37.2g / 100 g y 209.71g/100 g respectivamente) Vargas-Magaña, 2013), seguido de *C. arabica* CS (13.95 g / 100 g y 2.28 g / 100 g) y *C. arabica* SG (12.28 g / 100 g y 2.66 g / 100 g) equivalente a epicatequinas (Lecasble, 2011).

Obtención de aislados de *Haemonchus contortus*.

Las larvas infectantes (L₃) de *H. contortus* fueron obtenidas de las heces de dos cabras con una infección artificial mono-específica de un aislado local de *H. contortus* resistente a los bencimidazoles (Índice de resistencia = 44.4) y con baja susceptibilidad hacia los taninos (Índice de resistencia = 6.4), recuperado de una granja ovina de Umán, Yucatán (aislado Paraíso). Las larvas L₃ fueron obtenidas mediante coprocultivos de las heces de cabras donadoras y almacenadas en refrigeración (4 °C) hasta su uso. Los animales infectados fueron mantenidos en jaulas metabólicas de piso elevado para evitar infecciones con otros NGI. Además, recibieron alimento comercial y pasto de corte (*Pennisetum purpureum*) libre de NGI. El suministro de agua fue *ad libitum*.

Prueba de inhibición del desvaine larvario. Para evaluar la actividad AH *in vitro* de los extractos del subproducto percolado de *C. arabica* y de las hojas de *A. pennatula* se empleó la prueba de inhibición del desvaine larvario (IDL) descrita por Jackson y Hoste (2010). Se determinó la proporción de larvas L₃ de *H. contortus* expuestas a los extractos que no se desvainan en relación al éxito de las larvas control expuestas a PBS. Se empleó una suspensión de ~1000

L₃ de *H. contortus* por concentración evaluada (0, 150, 300, 600 y 1200 µg/ml en PBS). Las larvas fueron incubadas durante 3 h con las diferentes concentraciones de los extractos. Para el grupo control, las larvas fueron incubadas en PBS. Transcurrido el tiempo de incubación, las larvas fueron centrifugadas por tres minutos (157 g) y lavadas con una solución PBS en tres ocasiones. El desvaine fue inducido artificialmente empleando una solución de hipoclorito de sodio (16%) y cloruro de sodio (16.5%). El proceso de desvaine fue monitoreado por observación a microscopio (40x). El porcentaje de desvaine de larvas (% DL) fue identificado en los minutos 0, 20, 40 y 60. Se efectuaron 4 réplicas para cada una de las concentraciones evaluadas por cada extracto. El porcentaje de inhibición del desvaine larvario (%IDL) en los controles y en las concentraciones evaluadas fue determinado de acuerdo a la siguiente fórmula (Jackson y Hoste, 2010):

$$\% DL = (L_{3des} / L_{3t}) * 100$$

$$\% IDL = 100 - \% DL$$

Donde:

L_{3t} = total del número de larvas observadas

L_{3des} = número de larvas desvainadas.

Con el fin de determinar el papel de los taninos en el efecto AH se realizó otra serie de incubaciones de cada extracto usando polivinilpolipirrolidona (PVPP) como agente bloqueador de la actividad de los taninos (Makkar, 2003). En estos bioensayos se incluyeron únicamente la concentración de 1200 µg de extracto/ml PBS (con y sin PVPP) y sus respectivos controles (PBS).

Evaluación *in vivo*

Obtención del subproducto de *C. arabica*. El subproducto fresco de *C. arabica* (mezcla de las variedades CS y SG) fue obtenido directamente de los locales comerciales Starbucks® en Mérida, Yucatán. Este subproducto fue secado en estufas a una temperatura de 60 °C durante 24 horas. El material seco fue almacenado en contenedores de plástico a temperatura ambiente en el interior del laboratorio de nutrición animal del CCBA-UADY hasta su uso.

Animales experimentales. Se emplearon 18 ovinos de raza de pelo (cruza no definida de Pelibuey, Dorper y Katadin), con 4 meses de edad de ambos sexos. Los animales tenían un peso inicial promedio 15.2±2.6 kg. Estos fueron alojados individualmente en jaulas metabólicas 1.5m x 1m con piso elevado durante todo el experimento. Los animales presentaban una infección mono-específica con *H. contortus* del aislado Paraíso. Los animales infectados

fueron distribuidos por conveniencia en 3 grupos experimentales de 6 ovinos cada uno: Grupo Control (GC) que recibió una dieta sin *C. arábica*; Grupo Café (GCA) que recibió una dieta que contenía 10% de subproducto de *C. arábica*, y Grupo Café + PEG (GCA+PEG) que recibió una dieta que contenía 10% de subproducto de *C. arábica* y polietilén glicol (PEG) como bloqueador de los taninos. Los animales de los grupos GCA y GCA+PEG recibieron el subproducto percolado de café durante 20 días que fue la duración del experimento.

Cada animal recibió un alimento formulado de acuerdo a sus requerimientos nutricionales para crecimiento. La composición de la dieta ofrecida en cada uno de los grupos experimentales fue la siguiente: GC: se proporcionó 1 kg de alimento balanceado (sorgo molido, salvado de trigo, pasta de soya, heno de *Cynodon nlemfluensis*, excretas de pavo, sales minerales y melaza), GCA 900 g de alimento balanceado más 100 g de percolado de café, GCA+PEG: 900 g de alimento balanceado más 100 g de percolado de café con 50 g de PEG. Adicionalmente, todos los grupos experimentales recibieron 600 g de pasto *Pennisetum purpureum* fresco y picado diariamente.

Excreción de huevos de *Haemonchus contortus* en heces. Para evaluar el efecto de la inclusión del percolado de *C. arabica* sobre la eliminación de huevos de *H. contortus* en las heces, se colectaron tres muestras diarias de heces (aproximadamente 5 g cada una) directamente del recto. Los horarios de muestreo fueron a las 8:00, 11:00 y 14:00 horas durante todo el período de evaluación (20 días). Estas tres muestras diarias se realizaron para obtener un dato más representativo de la carga de huevos en heces de los corderos. El horario se decidió por conveniencia.

Las muestras de heces fueron procesadas empleando la técnica de McMaster para determinar el número de huevos por gramo de heces (HPG). Se pesaron 2 g de heces y se colocaron en un colador. Posteriormente se adicionaron 28 ml de una solución saturada de azúcar y las heces fueron maceradas. El líquido fue colocado en una cámara de McMaster y se observó al microscopio para la contabilización de huevos de nematodos. Para determinar la producción total de huevos en las heces (HTH) por animal por día durante todo el periodo de evaluación (20 días) se empleó el promedio de HPG de cada día y éste dato se multiplicó por la cantidad de heces totales producidas por animal por día (g BF/d).

Análisis estadístico

Los datos relativos a la inhibición del desvenne larvario fueron analizados empleando un diseño completamente al azar con su respectivo Modelo Lineal Generalizado, y se determinaron las diferencias significativas entre las concentraciones de extracto con su respectivo control mediante un análisis post-hoc usando LSD de Fisher con el programa estadístico Statgraphics 5.1 (Statgraphics, 2001).

El consumo total de materia seca (MS) de los diferentes grupos fue comparado con un ANOVA para un diseño completamente al azar y las medias fueron comparadas con una prueba de rango múltiple de Tukey.

Los resultados de la eliminación de huevos (HPG y HTH) de cada grupo fueron comparados empleando la prueba de Mann-Whitney.

RESULTADOS

Efecto antihelmíntico *in vitro*

En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos en la prueba de IDL empleando un aislamiento de *H. contortus* proveniente de Yucatán con una baja susceptibilidad a taninos condensados (Paraiso). Se observó que el desvenne de las larvas infectantes de *H. contortus* expuestas al extracto de hojas de *A. pennatula* fue inhibido a partir de la concentración de 300 µg/ml ($P < 0.05$) con un porcentaje de 41.5% respecto a su control. El 100% de inhibición fue alcanzado en las dos concentraciones más elevadas (600 y 1200 µg/ml; $P < 0.05$).

El extracto del subproducto de *C. arabica* variedad CS mostró una inhibición del desvenne larvario ($P < 0.05$) en todas las concentraciones evaluadas (61.5% a 100% de inhibición) respecto al control. Por otro lado, el extracto de *C. arabica* variedad SG solo mostró una inhibición respecto al control en la concentración más elevada (1200 µg/ml) ($P < 0.05$).

En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos en la prueba de IDL empleando la concentración de 1200 µg/ml, con y sin PVPP. Se observó que el desvenne de las larvas de *H. contortus* expuestas a *A. pennatula* fue inhibido en la concentración de 1200 µg/ml sin PVPP respecto al control ($P < 0.05$). No se encontró diferencia significativa entre la concentración 1200 µg/ml con PVPP y el control PBS. Respecto al extracto de *C. arabica* variedad CS este mostró una inhibición del desvenne larvario en la concentración 1200 µg/ml sin PVPP respecto al control (85.2% vs.

0% de inhibición respectivamente) ($P<0.05$). De igual manera se encontró diferencia entre la concentración 1200 $\mu\text{g/ml}$ con PVPP y el control PBS (47% vs. 0% de inhibición respectivamente). Para el extracto de *C. arabica* variedad SG se observaron diferencias entre las concentraciones de 1200 $\mu\text{g/ml}$ con y sin PVPP respecto al control (90.5%, 84.2% y 0% de inhibición respectivamente) ($P<0.05$).

Efecto antihelmíntico *in vivo*

En la tabla 3 se presentan los resultados obtenidos respecto al consumo de alimento en cada uno de los grupos experimentales del estudio. Los tres grupos experimentales tuvieron semejantes consumos totales

de alimento durante la prueba, así como de pasto y de concentrado ($P>0.05$). Dado que el subproducto percolado de *C. arabica* se ofrecía previamente mezclado con el concentrado (10% del alimento concentrado ofrecido), el consumo de subproducto de café fue semejante entre el grupo GCA y GCA+PEG (64.4 vs. 67.0 g/día respectivamente) ($P>0.05$).

En la tabla 4 se presenta el efecto de la ingesta de *C. arabica* sobre la excreción de huevos por gramo de heces (HPG) y excreción de huevos totales en heces (HTH) en ovinos infectados con *H. contortus*. No existió una reducción en la cuenta de HPG así como en la excreción de HTH entre los grupos GCA y GCA+PEG en comparación del grupo GC ($P>0.05$).

Tabla 1. Inhibición del desvaine (% a 60 min) de larvas L_3 de *Haemonchus contortus* aislado Paraíso, expuestas a diferentes concentraciones de extractos acetónicos de *Acacia pennatula* y de dos variedades de *Coffea arabica* (CS y SG).

| Extracto | PBS | 150 $\mu\text{g/ml}$ | 300 $\mu\text{g/ml}$ | 600 $\mu\text{g/ml}$ | 1200 $\mu\text{g/ml}$ | E.E.M. |
|----------------------|------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|--------|
| <i>A. pennatula</i> | 1.75 | 5.2 | 41.5* | 100* | 100* | 2.13 |
| <i>C. arabica CS</i> | 0.0 | 61.5* | 83.7* | 96.5* | 100* | 0.54 |
| <i>C. arabica SG</i> | 1.25 | 14.75 | 28 | 26.5 | 86.2* | 9.74 |

*: Indica diferencias estadísticas respecto a su control,
EEM: Error estándar de la media,
PBS: Phosphate buffered saline

Tabla 2. Inhibición del desvaine (% 60 min) de larvas L_3 de *Haemonchus contortus* aislado Paraíso, con adición de PVPP a extractos acetónicos de *Acacia pennatula* y de dos variedades de *Coffea arabica* (CS y SG).

| Extracto | PBS | Extracto 1200 $\mu\text{g/ml}$ | PVPP | E.E.M. |
|----------------------|-----|-----------------------------------|-------|--------|
| <i>A. pennatula</i> | 0 | 98.7* | 16.5 | 5.63 |
| <i>C. arabica CS</i> | 0 | 85.2* | 47* | 4.37 |
| <i>C. arabica SG</i> | 0 | 90.5* | 84.2* | 4.50 |

*: Indica diferencias estadísticas respecto a su control,
EEM: Error estándar de la media,
PBS: Phosphate buffered saline

Tabla 3. Consumo (Kg MS, media \pm EE) de alimento balanceado con y sin desecho de café (*Coffea arabica*) y pasto de corte (*Pennisetum purpureum*) y consumo total de alimento de los ovinos infectados con *Haemonchus contortus*, aislado Paraíso en cada uno de los grupos experimentales.

| | Control | Residuo café | Residuo café+ PEG |
|------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Consumo total | 0.897 \pm 61a | 0.773 \pm 66.9a | 0.847 \pm 74.8a |
| <i>Pennisetum purpureum</i> | 0.193 \pm 22.8a | 0.129 \pm 25a | 0.177 \pm 27.9a |
| Alimento balanceado | 0.704 \pm 51.8a | — | — |
| <i>Coffea Arabica</i> + alimento balanceado | — | 0.644 \pm 3.1a | 0.670 \pm 3.5a |

Diferentes letras entre columnas indican diferencia significativa (P <0.05)

KgMS= kilogramos en materia seca;

E.E.= Error estándar;

PEG= Polietilenglicol

Tabla 4. Efecto de la ingesta de *Coffea arabica* sobre la excreción fecal de huevos por gramos de heces (HPG) y excreción de huevos totales en heces (HTH) de *Haemonchus contortus* aislado Paraíso, en ovinos infectados (mediana y rango).

| | Control | Residuo café | Residuo café + PEG |
|------|---------------------|---------------------|----------------------|
| HPG | 465 (159-7299)a | 468 (241-1059)a | 837 (365-5063)a |
| HTHa | 7726 (4725-114031)a | 13152 (5931-34418)a | 28587 (13370-15303)a |

PEG: Polietilenglicol.,

Diferentes letras entre columnas indican diferencia significativa (P <0.05)

DISCUSIÓN

El presente trabajo evaluó el efecto AH *in vitro* e *in vivo* del subproducto percolado de *C. arabica* sobre un aislado de *H. contortus* de baja susceptibilidad a taninos.

Efecto antihelmíntico *in vitro*

Los resultados de la evaluación *in vitro* confirmaron que el aislado de *H. contortus* proveniente de un ovino infectado naturalmente en la vegetación nativa de Yucatán, presentó una menor susceptibilidad al extracto de hojas de *A. pennatula*, comparado con el efecto que ocasiona sobre aislados de *H. contortus* provenientes de otras regiones (Covarrubias-Cárdenas, 2013; Vargas-Magaña, 2013). Esta menor susceptibilidad del aislado de *H. contortus* utilizado, se confirmó comparando los resultados de las concentraciones de 150 y 300 μ g del extracto de *A. pennatula* contra el control (PBS) en la prueba IDL (inhibiciones de 5% y 41.4% respectivamente). Un estudio previo con otro aislamiento de *H. contortus* proveniente de Yucatán (Poxila) también presentó

una inhibición del desenvaine de solo 7.7% y 36.7% en las concentraciones 150 y 300 μ g respectivamente, lo cual es similar al aislado evaluado en este estudio. Por su parte, Covarrubias-Cárdenas. (2013), empleando la misma prueba, reportó porcentajes de inhibición de 29.3% y 98.11% en las concentraciones de 150 y 300 μ g, respectivamente, con un aislamiento de *H. contortus* susceptible a taninos proveniente de animales del centro de México (aislado FESC). Similarmente, Vargas-Magaña. (2013) encontró porcentajes de inhibición de 50% y 99% para las concentraciones de 150 y 300 μ g, con otro aislado de *H. contortus* proveniente también del centro de México (CENID-INIFAP).

La evaluación realizada con PVPP confirmó que el efecto AH observado para el extracto de *A. pennatula* es atribuible a los taninos presentes en el extracto ya que su efecto AH es bloqueado casi completamente por el PVPP que es un inhibidor de taninos. Resultados similares fueron reportados para el caso de otros aislados de *H. contortus* provenientes del centro del país (Covarrubias-Cárdenas, 2013; Vargas-Magaña, 2013).

Los resultados obtenidos en este estudio apoyan la hipótesis de que los aislados de *H. contortus* obtenidos en Yucatán son menos susceptibles a los taninos de las plantas de Yucatán (por ejemplo *A. pennatula*), en comparación con aislados de otras regiones que no están expuestos a estos metabolitos. Otros factores que pueden ser considerados para explicar esta variabilidad entre los aislados con diferente origen geográfico, pueden ser: (a) diferencias en la concentración de los metabolitos entre plantas de la misma especie en la región, (b) diferencias debidas al órgano (parte) de la planta de la cual se extraen los metabolitos y (c) tipo de extracción realizada (acetónica, metanólica, etc.) (Kahiya et al., 2003; Makkar et al., 2007; Hoste et al., 2009; Alonso-Díaz et al., 2011).

Respecto a los resultados de la evaluación del efecto AH del extracto de *Coffea arabica*, la variedad CS tuvo una mayor eficacia para inhibir el desvenne a partir de la concentración 150 µg/ml (61.5%; $P < 0.05$) en comparación con la variedad SG que causó inhibición sólo en la concentración de 1200 µg/ml (86.2%; $P < 0.05$). Covarrubias-Cárdenas. (2013) empleando las mismas variedades de subproducto de café pero utilizando un aislamiento de *H. contortus* del Centro de México (FESC) encontró una inhibición significativa a partir de la concentración 300 µg/ml (57.53%) en la variedad CS y para la variedad SG, la inhibición eficaz fue observada en las concentraciones 600 y 1200 µg/ml (83.05 y 94.12 %, respectivamente). Los resultados de ambos estudios sugieren que la variedad CS es más eficaz contra *H. contortus* en pruebas *in vitro* que la variedad SG. Esta variabilidad de la eficacia AH *in vitro* de los extractos acetónicos de *C. arabica* se había reportado en otros estudios realizados con extractos de diferentes marcas comerciales de café. En general, se obtienen reducciones del desvenne de *H. contortus* en las concentraciones de 600 a 1200 µg/ml, tanto en aislados de *H. contortus* de Francia (Vargas-Magaña, 2013) como de México (Chan-Pérez et al., 2012; Vargas-Magaña, 2013). La variación en la eficacia de los extractos de *C. arabica* observada puede deberse a las diferencia de procesamiento como secado, tostado, percolado y extracción, que pueden afectar la cantidad de compuestos secundarios presentes en los extractos.

Por otra parte, los resultados obtenidos con el uso del PVPP mostró que los taninos provenientes del subproducto de *Coffea arabica* no fueron los principales responsables del efecto AH *in vitro* sobre el aislado de *H. contortus* con baja susceptibilidad a los taninos. Es decir, el efecto AH *in vitro* pudo deberse a compuestos secundarios distintos a los taninos o polifenoles, ya que dentro del café concurren más de 1500 sustancias bioquímicamente

activas (Gutiérrez, 2002). Esto fue más evidente con el extracto de *C. arabica* SG. Otros estudios realizados recientemente con extractos acetónicos de *C. arabica* muestran también que una parte importante del efecto AH se mantiene aún en presencia del PVPP (Covarrubias-Cárdenas, 2013; Vargas-Magaña, 2013).

Efecto antihelmíntico *in vivo*

El presente estudio demostró que la inclusión de subproducto de café en el alimento concentrado de los ovinos (10% del alimento balanceado) no produjo un efecto AH contra un aislado de *H. contortus* de baja susceptibilidad a taninos. En este estudio se observó que los ovinos suplementados con 10% del subproducto de *C. arabica* (grupos GCa y GCa+PEG) presentaron un consumo similar de pasto y de alimento, y por ende de subproducto de café. Es decir, un consumo de aproximadamente 65 g de café percolado por día no fueron suficientes para ocasionar un efecto AH sobre la carga de huevos en heces (HPG y HTH). Estos resultados contrastan con los obtenidos en el estudio de Covarrubias-Cárdenas (2012) realizado con ovinos infectados artificialmente con un aislado de *H. contortus* susceptible a taninos. En este último, los ovinos consumían cantidades semejantes de subproducto de café percolado (57.5 y 61.1 g/d para el grupo sin PEG o con PEG, respectivamente) y dicho nivel de consumo ocasionó una porcentaje de reducción de HPG del 70%. Aunque dicha reducción de HPG no fue significativa ($P > 0.05$). Sin embargo, en la recuperación de los nematodos adultos (estudio *post-mortem*) se observó una reducción significativa de 25% en la fecundidad de las hembras de *H. contortus* de los ovinos que consumieron el subproducto del café ($P < 0.05$). Esta diferencia entre los resultados de un aislado susceptible (FESC) y uno de baja susceptibilidad a taninos (Paraíso), puede ser la expresión de la plasticidad fenotípica de los NGI contra los compuestos secundarios de las PRT. El aislado Paraíso ha tenido una constante exposición a PRT y otros compuestos secundarios de la vegetación de Yucatán y esto puede ocasionar cierta reducción en la susceptibilidad a estos compuestos. Estos ajustes aumentan la probabilidad de supervivencia de los NGI que les permitirían mantener sus funciones fisiológicas fundamentales en entornos altamente heterogéneos (Gianoli, 2004).

En conjunto, los resultados previos y los encontrados en este trabajo confirman la posible existencia de diferencias en la susceptibilidad de los aislados de *H. contortus* de Yucatán y de otras zonas de México y el mundo.

Por otro lado, un estudio previo realizado con caprinos infectados artificialmente con un aislado de *H. contortus* originario de Yucatán (UADY)

(Palomo-Couoh, 2012) demostró que los caprinos son capaces de consumir casi el doble de la cantidad de subproducto de café que consumen los ovinos del presente estudio y del estudio de Covarrubias-Cárdenas. (2013). Este mayor consumo de subproducto de café en caprinos ocasionó una reducción significativa de la fecundidad (reducción del 51.3 %) y la longitud de las hembras (reducción de 6.8%) de éste parásito ($P < 0.05$). Además de una reducción de 43% en la eliminación de huevos en heces que no resultó significativa. Este efecto AH fue reportado en caprinos infectados con un aislado Yucateco de *H. contortus* de baja susceptibilidad a taninos (Vargas-Magaña, 2013). Aparentemente, la mayor capacidad de los caprinos de consumir materiales ricos en taninos y otros compuestos secundarios, comparado con los ovinos, permitió lograr un efecto AH que no se alcanzó a detectar en los ovinos del presente estudio. Esta mayor capacidad de consumir plantas ricas en taninos de los caprinos, comparado con los ovinos, ha sido demostrada por González-Pech et al. (2015) en la vegetación nativa de Yucatán.

La adición de PEG al café no incrementó el consumo voluntario de la dieta con café (GCA+PEG) y tampoco afectó la cuenta de huevos en heces. La ausencia de efecto de PEG sobre el consumo de materiales ricos en taninos y otros compuestos secundarios ha sido previamente reportada para ovinos consumiendo follaje de PRT (Martínez-Ortiz-de-Montellano et al., 2010; Galicia-Aguilar et al., 2012; Méndez-Ortíz et al., 2012). De la misma manera, la adición de PEG a dietas con subproducto de café no incrementa el consumo de este subproducto (Palomo-Couoh, 2012; Covarrubias-Cárdenas, 2013). En otras latitudes, el PEG se utiliza para aumentar el consumo de materiales ricos en taninos en rumiantes (Perevolovsky et al., 2006). Sin embargo, los animales de Yucatán parecen tener plasticidad fenotípica en su saliva que les permite un elevado consumo de materiales ricos en compuestos secundarios y la adición de PEG no favorece un mayor consumo (Vargas-Magaña, 2013).

CONCLUSIÓN

El extracto acetónico del subproducto de *C. arabica* posee un efecto AH *in vitro*. Sin embargo, el consumo de alimento conteniendo un 10% del subproducto no produjo un efecto AH *in vivo* en ovinos infectados con el aislado Paraíso de *H. contortus*. La ausencia del efecto AH *in vivo* se puede atribuir a la baja susceptibilidad a los compuestos secundarios de las PRT que presenta el aislado de *H. contortus* empleado en este estudio.

Conflicto de intereses

Los autores de este manuscrito no tienen relaciones financieras o personales con otras personas u organizaciones que pueden influir de forma inapropiada o sesgar el contenido del documento.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado financieramente por el CONACYT (No. 290674), el proyecto de colaboración entre Francia y México (CONACYT PCP 04/09) del proyecto IEPAC (FEDER Convention No. 31439 - Program INTERREG IV CARAIBES 2007-2013 - No. 41000140). Guadalupe I. Ortiz Ocampo reconoce haber recibido una beca del CONACYT, México, para sus estudios de Maestría.

REFERENCIAS

- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Capetillo-Leal, C., Brunet, S., Hoste, H., 2008. Effects of four tropical tanniferous plant extracts on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. *Veterinary Parasitology*. 153, 187-192.
- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., 2011. Comparing the sensitivity of two *in vitro* assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannins rich plant extracts against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 181, 360-364.
- Brunet, S., Martínez-Ortiz-de-Montellano, C., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar-Caballero, A.J., Capetillo-Leal, C., Hoste, H., 2008. Effect of the consumption of *Lysiloma latisiliquum* on the larval establishment of gastrointestinal nematodes in goats. *Veterinary Parasitology*. 157, 81-88.
- Calderón-Quintal, J.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Alonso, M.A., Hoste, H., Aguilar-Caballero, A.J., 2010. Adaptation of *Haemonchus contortus* to condensed tannins: can it be possible? *Archivos Medicina Veterinaria*. 42, 165-171.
- Chan-Pérez, J.I., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Vilarem, G., Mathie, C., Vargas-Magaña, J.J., 2012. Efecto de un subproducto Agorindustrial (*Coffea arabica*) sobre el desenvaine de larvas de *Haemonchus contortus*. VII Seminario Internacional de Parasitología Animal. 494-499.

- Chan-Pérez, J.I., Torres-Acosta, J.F., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Castañeda-Ramirez, G.S., Vilarem, G., Mathieu, C. 2016. In vitro susceptibility of ten *Haemonchus contortus* isolates from different geographical origins towards acetone:water extracts of two tannin rich plants. *Veterinary Parasitology*. 217, 53-60.
- Covarrubias-Cárdenas, A.G., 2013. Evaluación del efecto antihelmíntico de un subproducto de *Coffea arabica* sobre un aislado de *Haemonchus contortus* susceptible a taninos. MSc Tesis. Universidad Autónoma de Yucatán. México.
- Galicia-Aguilar, H.H., Rodríguez-González, L.A., Capetillo-leal, C.M., Cámara-Sarmiento, R., Aguilar-Caballero, A.J., Sandoval-Castro, C.A., Torres-Acosta, J.F.J., 2012. Effects of *Havardia albicans* supplementation on feed consumption and dry matter digestibility of sheep and the biology of *Haemonchus contortus*. *Animal Feed Science Technology* 176, 178-184.
- García, D.E. 1988., Modificaciones al sistema de clasificación climática Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la república Mexicana) 3a edición. México, D.F. Pp.120.
- Gianoli, E., 2004. Plasticidad Fenotípica adaptativa en plantas. Pp. 13-25. En: Marino-Cabrera, H. Editorial Fisiología Ecológica en plantas Mecanismos y respuestas a estrés en los ecosistemas. Valparaíso, Chile.
- González-Pech, P., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Tun-Garrido, J. 2015. Feeding behavior of sheep and goats in a deciduous tropical forest during the dry season: The same menu consumed differently. *Small Ruminant Research*. 133, 128-134..
- González-Pech, P.G., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A. 2014. Adapting a bite coding grid for small ruminants browsing a deciduous tropical forest. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 17:63-70.
- Gutiérrez, M, A. 2002. Café, antioxidantes y protección a la salud. *Medisan*. 4, 72-81.
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S. O., 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitology*. 22, 253-61.
- Hoste, H., Brunet, S., Paolini, V., Bahuaud, D., Chauveau, S., Fouraste, I., Lefrileux, Y., 2009. Compared *in vitro* anthelmintic effects of eight tannins-rich plants browsed by goats in the southern part of France. *Options Méditerranéennes*. 85, 431-436
- Jabbar, A., Iqbal, Z., Kerboeuf, D., Muhammad, G., Muhammad, K., Afaq, M., 2006. Anthelmintic resistance: The state of play revisited. *Life Sciences*. 79, 2413-2431.
- Jackson, F., Hoste, H., 2010. *In vitro* methods for the primary screening of plant products for direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes. In: *In vitro* screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: Nuclear and related methodologies. Vercoe, P.E., Makkar, H.P.S., Schlink, A.C., (Eds). Springer. Pp. 25-45.
- Kahiya, C., Mukaratirwa, S., Thamsborg, S.M., 2003. Effects of *Acacia nilotica* and *Acacia karoo* diets on *Haemonchus contortus* infection in goats. *Veterinary Parasitology*. 115, 265-274.
- Kaplan, R.M., Vidyashankar, A.N., 2012. An inconvenient truth: Global warming and anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*. 186, 70-78.
- Lecasble, C., 2011. Le marc de cafe comme source non conventionnelle de tanins condensés dans le controle alternatif des nematodes gastrointestinaux chez les petits ruminants du Yucatan, Mexique. MSc Thesis. Ecole Nationale Veterinaire Toulouse, Francia.
- Makkar, H.P., 2003. Quantification of Tannins in Tree and Shrub foliage. A Laboratory Manual Food and Agriculture Organization of the United Nations/International Atomic Energy Agency (FAO/IAEA), Vienna, Australia. Pp. 49-53.
- Makkar, H.P.S., Francis, G., Becker, K., 2007. Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. *Animal*. 1, 1371-1391.
- Martínez-Ortíz-de-Montellano, C., Vargas-Magaña, J.J., Canul-Ku, H.L., Miranda-Soberanis, R., Capetillo-Leal, C., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., 2010. Effect of tropical tannin-rich plant *Lysiloma latisiliquum* on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary Parasitology*. 172, 283-290.
- Méndez-Ortíz, F.A., Sandoval-Castro, C.A., Torres-Acosta, J.F.J., 2012. Short term consumption of *Havardia albicans* tannin rich fodder by sheep: Effects on feed intake, diet digestibility and excretion of *Haemonchus*

- contortus* eggs. Animal Feed Science Technology. 176, 185-191.
- Palomo-Couoh, J.G., 2012. Efecto de la alimentación con follaje de chimay (*Acacia pennatula*), y el desecho de café (*Coffea arabica*) en la regulación parasitaria de caprinos. MSc Thesis. Universidad Autónoma de Yucatán.
- Perevolotsky, A., Laundau, S., Silanikove, N., Provenza, F., 2006. Upgrading tannin-rich forages by supplementing ruminants with polyethylene glycol (PEG). Pp. 221-233.
- Sandoval-Castro, C.A., Hovell, D., Torres-Acosta, J. F. J., Ayala-Burgos, A. Herbivores: assessment of intake, digestibility and the roles of secondary compounds. Editorial, Nottingham University Press, Nottingham.
- Price, L.M., Butler, G.L., 1977. Rapid visual estimation and spectrophotometric of tannin contents of sorghum grain. Journal Agriculture Food Chemistry. 25, 1268-1273.
- Sandoval-Castro, C.A., Torres-Acosta, J.F.J., Hoste, H., Salem, A.Z.M., Chan-Pérez, J.I. 2012. Using plant bioactive materials to control gastrointestinal tract helminths in livestock. Animal Feed Science and Technology. 176, 192-201
- Torres-Acosta, J.F.J., Molento, M., Mendoza de Gives, P., 2012. Research and implementation of novel approaches for the control of nematode parasites in Latin America and the Caribbean: is there sufficient incentive for a greater extension effort. Veterinary Parasitology. 186, 132-142.
- Vargas-Magaña, J.J., 2013. Respuesta fisiológica de los ovinos y sus nematodos gastrointestinales a los taninos. PhD Thesis. Universidad Autónoma de Yucatán. México.

Submitted January 30, 2015 – Accepted November 16, 2015