



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :
Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :
Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition (PATOGEN)

Présentée et soutenue par :
Cintli MARTINEZ-ORTIZ-DE-MONTELLANO
le : vendredi 12 novembre 2010

Titre :
Mécanismes d'action de plantes riches en tanins sur les nématodes
gastrointestinaux adultes des petits ruminants

JURY
M Pedro MENDOZA-DE-GIVES: Directeur de Recherche CENID-PAVET Morelos, Mexique
M Antonio ORTEGA-PACHECO: Professeur de l'Université Autonome du Yucatan, Mexique
M Sergio GUILLEN-HERNANDEZ - Professeur de l'Université Autonome du Yucatan, Mexique
M Armin AYALA-BURGOS - Professeur de l'Université du Yucatan, Mexique
Mme Pilar DE FRUTOS FERNANDEZ - Chercheur à l'Université de León, Espagne

Ecole doctorale :
Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :
UMR 1225 INRA/ENVT Interactions Hôte-Agent Pathogène

Directeur(s) de Thèse :
Dr. HOSTE H. et Dr. TORRES-ACOSTA J.F.J.

Rapporteurs :
Dr. P. MENDOZA-DE-GUIVES, Dr. S. GUILLEN-HERNANDEZ et Dr. P. De FRUTOS



Université
de Toulouse



UADY

CAMPUS DE
CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS
"Luz, Ciencia y Verdad"

FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA
UNIDAD DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Mecanismos de acción de las plantas ricas en taninos sobre la población adulta de nematodos gastrointestinales de los pequeños rumiantes

TESIS EN COTUTELA

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

POR:

M. en C. CINTLI MARTINEZ ORTIZ DE MONTELLANO

ASESORES

Dr. Juan Felipe de Jesús Torres Acosta

Dr. Hervé Hoste

Dr. Carlos Alfredo Sandoval Castro

Mérida, Yucatán; México, Noviembre de 2010



DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

ALUMNO: M. en C. CINTLI MARTINEZ ORTIZ DE MONTELLANO

SINODO DEL EXAMEN DE TESIS DE GRADO

Dr. Pedro Mendoza de Guives
CENID-PAVET
INIFAP



Dr. Antonio Ortega Pacheco
Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
UADY



Dr. Sergio Guillén Hernández
Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
UADY



Dr. Armín Ayala Burgos
Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
UADY



Dr. Hervé Hoste
UMR 1225 IHAP
INRA/ENVT



Mérida, Yucatán; México, Noviembre de 2010

DECLARACIÓN

El presente trabajo no ha sido aceptado para el otorgamiento del título o grado alguno. La tesis es resultado de las investigaciones del autor excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán, México así como al Instituto Nacional Politécnico de Toulouse, Francia para la reproducción del documento con fines de intercambio bibliotecario.

M en C. Cintli Martínez Ortiz de Montellano

DÉCLARATION

Le présent travail n'est pas encore accepté pour conférer le titre de Docteur d'Université. Cette thèse est le résultat des travaux de recherche effectués par l'auteur seule à l'exception des références aux travaux d'autres auteurs. L'auteur donne permission à la Faculté de Médecine Vétérinaire et Zootechnique de l'Université Autonome du Yucatán, Mexique ainsi qu'à l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France pour réaliser des copies de ce document à fin d'échanges entre bibliothèques.

Mme. Cintli Martínez Ortiz de Montellano

« A mi abuela Ana y a mi Madre»

AGRADECIMIENTOS/REMERCIEMENTS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de doctorado.

Al proyecto CONACYT-SAGARPA-COFUPRO, México (No. 12440) por el financiamiento de los experimentos realizados en México.

Un remerciement à **l'Institut National Polytechnique de Toulouse (INPT) et au Programme Européen Marie Curie «Healthy Hay»** ainsi qu'au **projet ECOS-Nord** entre la France et le Mexique pour l'aide financière ayant permis la réalisation de ces travaux de thèse.

Je remercie vivement la **Maison Universitaire Franco-Mexicaine**, et particulièrement le Dr. Julian MONTEMAYOR et Mme. Lydie SIMON pour leur appui constant. Grâce à vous, cette thèse de cotutelle est devenue une réalité.

A mis asesores en México, el **Dr. Felipe Torres Acosta**, por su paciencia, por sus conocimientos, por su amistad y recordarme que Dios siempre está cerca; y al **Dr. Carlos Sandoval Castro**, por su objetividad en cada paso de esta tesis, por su valiosa e indispensable colaboración y apoyo para la finalización de este proyecto y claramente su amistad.

Je tiens remercier mon Directeur de thèse en France, le **Dr. Hervé HOSTE**, de m'avoir accepté faire partie de l'équipe « Interactions Nématodes-Milieu Digestif », pour le soutien technique et scientifique apporté, pour sa patience, sa gentillesse avec ma famille et moi-même et, finalement pour me montre quelques beaux paysages de France.

A todos los miembros del H. Sínodo, Dr. Pedro Méndoza de Gives, Dr. Antonio Ortega Pacheco, Dr. Sergio Guillén Hernández y Dr. Armín Ayala Burgos por sus sugerencias y apoyo durante el desarrollo de esta tesis.

A la **Dra. Pilar de Frutos**, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas del Instituto de Ganadería de Montaña de la Universidad de León, España; por sus importantes contribuciones y sugerencias como examinadora de ésta tesis.

Un especial agradecimiento al **Dr. Andrés Aluja Shunemann** porque gracias a usted y su gestionamiento, existe la COTUTELA. Esta tesis, también es gracias a su constante motivación, su respeto y amistad.

A la Unidad de Posgrado de la FMVZ-UADY, en especial al director el Dr. Hugo Delfín González y a Elsy Zapata Orozco por todo el apoyo brindado durante el doctorado.

A special thank to Dr. Ian BEVERIDGE from Faculty of Veterinary Science in the University of Melbourne, Australia; for his knowledge and contribution given to this work especially in the comments on the nematode microphotographs in Transmission electron Microscopy.

Al Dr. Pedro Mendoza de Gives del CENID-PAVET-INIFAP por su valiosa contribución a esta tesis y por las cepas de *Haemonchus contortus* donadas.

Al Tec. Hist. Gregory Arjona Torres del Laboratorio de Parasitología Marina del CINVESTAV-Mérida, por su desinteresado apoyo en el proceso de histología de los parásitos y por recibirme tan amablemente en su laboratorio.

Al M. en C. Leonardo Guillermo Cordero por su importante y valiosa contribución a ésta tesis en materia de histología, patología y fisiología. Fue un enorme placer trabajar contigo. Gracias amigo.

A las químicas Raquel Miranda Soberanis, Mary May Martínez y Concepción Capetillo Leal por su incondicional apoyo y colaboración durante el desarrollo de esta tesis, pero más que nada les agradezco cada bonita palabra y buenos consejos que al final de cuentas se resume en su AMISTAD.

Al personal de la Unidad de Diagnóstico de la FMVZ-UADY, Malena Uribe Mestre, José Aguilar Celis, William Ramón Arguez, QFB. Geny Ramírez; a la MVZ. Marissa Pérez Cruz y el Sr Enrique Cocom Celis del Área de Pequeños Rumiantes; al personal del Área de Nutrición al Sr. Juan Noh Celis, al Sr. Rafael Carcaño y a los trabajadores de dicha área que me recibían con gesto amable todos los días, por el incondicional apoyo que me brindaron durante los experimentos *in vivo* realizados en México.

Al Dr. Armando J. Aguilar y al **Dr. Ramón Cámara Sarmiento** del Área de Pequeños Rumiantes de la FMVZ-UADY, por su apoyo en el desarrollo de los experimentos *in vivo* y sus valiosos y acertados comentarios para el desarrollo de ésta tesis, además de su sincera amistad.

A mis compañeros y amigos, Dra. Nadia Ojeda Robertos, M. en C. Lorena Canul Kú, M.V.Z. Rodrigo Carrillo Peraza, M. en C. Israel Pérez Chan, M.V.Z. Javier Ventura Cordero, M.V.Z. Ariel Nieves Guerrero por su enorme labor y apoyo en los experimentos, así como su amistad.

Al Dr. Miguel Ángel Alonso Díaz y su esposa **Carolina Leme De Magalhaes Labarte**, por haberme apoyado durante toda la tesis, pero sobre todo por la amistad de tantos años.

Je tiens à remercier **Mlle. Celia ARROYO LOPEZ, Marine DEBOUCHAUD, Mme. Sylvie ADOTE et Fotini MANOLARAKI** ainsi que **Mr. Eric PARDO et Eric AZANDO**, pour leur aide technique pendant les dures journées au Laboratoire ainsi que pour leur amitié et leurs encouragements pendant mes séjours en France.

Je remercie également **Mme Céline BLEUART et Mme. Isabelle PARDO** du Laboratoire d'Anatomie Pathologique de l'ENVT pour leur amitié et leur gentillesse, lors des longues journées passées pour préparer mes coupes d'histologie.

Je remercie énormément à **Isabelle FOURQUAUX** du Centre du Microscopie Electronique Appliquée a la Biologie de L'Université Paul Sabatier, pour m'avoir fait découvrir le monde magnifique de la microscopie électronique à balayage et à transmission. MERCI, Isa pour ta patience, ton beau travail, ton amitié et ton sourire pendant le formidable travail avec les « petits bêtes ».

Un grand MERCI à **Séverine BRUNET, Fotini MANOLARAKI et Athanasios FYSIKOPOULOS** trois grands scientifiques, excellent collègues, et de très bons amis.

Egalement je tien remercier à ma famille en France, **la Famille GRÊNET** et mon autre famille qui m'ont reçu avec une grand gentillesse pendant mes séjours : **M. et Mme. DUMAS**.

Je dis MERCI ! à **Mme. Françoise HOSTE** pour sa gentillesse, pour son accueil, pour les énormes soirées et repas, pour ses conseils et pour être une très belle française. Françoise vous et votre famille seront toujours dans mon cœur. Je ne vous oublierai jamais!

A mis amigas y hermanas Mónica, Magui, Janyce y Yolanda por estar siempre conmigo y por apoyarme en todo momento.

A mi numerosa familia, en especial a mis Padres y a mis hermanos, Yei y Uru. De igual forma este agradecimiento es extensivo para mis suegros Jorge Carlos y Carmita y toda la familia: abuelas, tíos, primos, cuñados, concuños, sobrinos, etc.

A Juan Pablo, por ser el hermoso ser que eres, por tu paciencia, por tu apoyo, por secar mis lágrimas, por compartir mis risas, por descubrir conmigo nuevos mundos y por hacer mi vida una aventura. Gracias por tu amor. Este largo y difícil camino no lo hubiera logrado nunca sin ti. Esta tesis es tanto tuya como mía, para los dos ha sido una tesis de VIDA.

A todas las personas mencionadas y las que fueron omitidas sin su apoyo y participación, éste trabajo no hubiera sido posible.

Y finalmente, *a Dios y María...*

RESUMEN

Los nemátodos gastrointestinales (NGI) representan un problema de salud a nivel mundial en los sistemas de producción ovina y caprina en pastoreo. El control de estos parásitos se ha dificultado por la aparición de nemátodos con resistencia a los antihelmínticos (AH) disponibles comercialmente. La utilización de plantas ricas en taninos (PRT), como AH no convencionales, constituye una alternativa de control de las parasitosis. Sin embargo, el mecanismo de acción de dichas plantas sobre los NGI adultos aún se desconoce. El objetivo del estudio fue determinar el efecto directo e indirecto de las PRT sobre la población adulta de NGI en pequeños rumiantes. Se entiende como efecto directo aquella acción sobre la biología, estructura y/o ultraestructura del nemátodo similar a un AH. El efecto indirecto es una modificación de la respuesta inmune a nivel de la mucosa gastrointestinal del hospedero que afecta la biología de los NGI. El presente trabajo se divide en dos etapas: Primera etapa) Dos experimentos *in vivo* realizados en México y Francia respectivamente, determinaron los efectos directos e indirectos sobre la biología de los NGI debidos al consumo de forraje de las PRT tzalam (*Lysiloma latisiliquum*), sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) así como un extracto rico en taninos, quebracho (*Schinopsis spp*). Se utilizaron corderos infectados con *Haemonchus contortus* (México) o *H. contortus* y *Trichostrongylus colubriformis* (Francia). El consumo de tzalam afectó la longitud y fertilidad de las hembras de *H. contortus*. En tanto que, el quebracho redujo la población de *H. contortus* y *T. colubriformis* afectando también la fecundidad de *T. colubriformis*. El sainfoin afectó la fecundidad de *H. contortus* sin afectar a *T. colubriformis*. El efecto indirecto no fue evidente. Segunda etapa). Un bioensayo *in vitro* y dos experimentos *in vivo* con cabras infectadas con *H. contortus* permitieron conocer el efecto del consumo de PRT (tzalam o sainfoin) sobre la estructura y la ultraestructura de *H. contortus*. Se encontraron alteraciones en cutícula y región cefálica. Los agregados en la vulva solo se encontraron *in vitro*. La ultraestructura de *H. contortus* presentó un proceso de vacuolización en el tejido intestinal y muscular de estos nemátodos. Las lesiones sugieren que los compuestos del follaje de PRT pueden intervenir en funciones vitales de *H. contortus* como la movilidad, la nutrición y posiblemente la reproducción. El presente estudio es una contribución al conocimiento de los mecanismos de acción AH de las PRT contra NGI.

Palabras clave: mecanismos de acción, plantas ricas en taninos, nemátodos, pequeños rumiantes.

RESUME

Les nématodes gastro-intestinaux (NGI) représentent un problème sanitaire majeur dans le monde entier en systèmes de production à l'herbe des élevages de moutons et de chèvres. La maîtrise de ces parasites est désormais compliquée par l'apparition de résistances aux anthelminthiques (AH) chez les nématodes. L'utilisation de plantes riches en tanins (PRT) comme AH non conventionnels est une des alternatives possibles au contrôle chimique de ces maladies parasitaires. Cependant, le mécanisme d'action de ces plantes sur les vers adultes demeure inconnu. Cet objectif a constitué le premier but de cette étude en particulier en essayant de déterminer quelle part jouent les effets directs et indirects dans l'action des PRT sur les populations de Nématodes adultes dans le tractus digestif des petits ruminants. Un effet direct correspond à une action de type pharmacologique sur la biologie, la structure et l'ultrastructure des nématodes liés à des composés biochimiques présents dans les PRT. L'hypothèse d'un effet indirect correspondrait une modification de la réponse cellulaire dans les muqueuses gastro-intestinales de l'hôte, affectant la biologie des NGI. Cette thèse est divisée en deux parties: 1) Deux expériences *in vivo* réalisées respectivement, au Mexique et en France, visant à déterminer les effets directs ou indirects sur la biologie des NGI liés à la consommation de PRT tel le tzalam (*Lysiloma latisiliquum*), une Légumineuse arbustive du Yucatan, le sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) une Légumineuse fourragère tempérée, et ainsi que le quebracho(*Schinopsis spp.*), un extrait riche en tannins condensés. Les agneaux ont été infestés par *Haemonchus contortus* (au Mexique) ou *H. contortus* et *Trichostrongylus colubriformis* (en France). La consommation de tzalam a provoqué une perturbation de croissance des vers ou de fertilité des femelles d'*H. contortus*. Selon la durée de consommation, le quebracho a réduit la population de *H. contortus* et *T. colubriformis*, et affecte également la fertilité de *T. colubriformis*. Le sainfoin a affecté la fécondité de *H. contortus* sans affecter celle de *T. colubriformis*. Le comptage de cellules effectrices dans les muqueuses pour évaluer l'implication d'un effet indirect n'a pas montré de différences significatives entre les lots recevant ou non des PRT. La seconde partie s'est fondée sur un test *in vitro* et deux essais *in vivo* chez des chèvres infestées par *H. contortus* pour mieux comprendre l'effet de la consommation de PRT (tzalam, au Mexique ou sainfoin, en France) sur la structure et l'ultrastructure d'*H. contortus*. Les principales altérations ont été trouvées dans la cuticule et la région céphalique des vers. Des agrégats de matériel végétal autour de la vulve n'ont été trouvés qu'*in vitro*. L'examen de l'ultrastructure des *H. contortus* a montré des signes de vacuolisation, surtout visible dans les tissus intestinaux et musculaires. Ces lésions suggèrent que des composés secondaires présents dans le feuillage des PRT peuvent être impliqués dans les fonctions vitales d'*H. contortus*, telles que la mobilité, la nutrition et éventuellement la reproduction.

Mots-clés: Mécanismes d'action, plantes riches en tannins, nématodes, petits ruminants, *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, Microscopie électronique.

SUMMARY

Gastrointestinal nematodes (GIN) represent a major health problem worldwide in grazing sheep and goat production systems. The control of these parasites has been complicated by the emergence of nematodes which are resistant to the commercially available anthelmintics (AHs). The use of tannin rich plants (TRP), as non-conventional Ahs, represents an alternative for the control of these parasites. However, the mechanism of action of such plants against adult populations of GIN has not been determined. The objective of the study was to determine the direct and indirect effect of TRP against adult populations of GIN in small ruminants. A direct effect is considered to be any action against the biology, structure and/or ultrastructure of the nematodes which is similar to a chemical AH. The indirect effect is a modification of the immune response of the host at the level of the gastrointestinal mucosa which affects the biology of the GIN. This study is divided into two stages: First stage) Two *in vivo* experiments conducted in Mexico and France respectively, determined the direct and indirect effects on the biology of GIN due to the consumption of the TRP forage of tzalam (*Lysiloma latisiliquum*), sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) as well as a tannin-rich quebracho extract (*Schinopsis spp*). Lambs were artificially infected with *Haemonchus contortus* (Mexico) or *H. contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* (France). The consumption of tzalam affected the length and fertility of *H. contortus* females. Meanwhile, the quebracho extract reduced the population of *H. contortus* and *T. colubriformis* also affecting the fecundity of *T. colubriformis*. The sainfoin affected the fecundity of *H. contortus* without affecting *T. colubriformis*. The indirect effect was not evident. Second stage) An *in vitro* assay and two *in vivo* experiments with goats infected with *H. contortus* allowed to identify the effect of the consumption of TRP (tzalam or sainfoin) on the structure and ultrastructure of *H. contortus*. Alterations in cuticle and cephalic region were found. The aggregates in the vulva were only found *in vitro*. The ultrastructure of *H. contortus* showed a vacuolization process in the intestinal and muscular tissues of these nematodes. The lesions suggest that the compounds contained in the foliage of TRP may be involved in vital functions of *H. contortus* such as mobility, nutrition and possibly reproduction. This study is a contribution towards the understanding the mechanisms of AH action of the TRP against GIN.

Keywords: mechanisms of action, tannin-rich plants, nematodes, small ruminants.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1 LOS NEMÁTODOS GASTROINTESTINALES EN LOS PEQUEÑOS RUMIANTES	2
2.2 TRATAMIENTOS ANTIHELMÍNTICO	5
2.3 LA RESISTENCIA ANTIHELMÍNTICA	6
2.4 MÉTODOS ALTERNATIVOS A LOS ANTIHELMÍNTICOS CONVENCIONALES	7
2.5 TANINOS	10
2.5.1 Propiedades fisicoquímicas	11
2.5.2 Propiedades biológicas	12
2.5.3 Clasificación de los taninos	14
2.5.4 Plantas Ricas en Taninos	18
2.5.5 Efectos de los taninos sobre la fisiología y producción de los pequeños rumiantes	22
2.5.6 Consumo de las Plantas Ricas en Taninos por los pequeños rumiantes	28
2.5.7 Efecto Antihelmíntico de los Taninos Condensados	29
3. HIPÓTESIS	35
4. OBJETIVOS	35
5. REFERENCIAS	36
6. ARTÍCULOS	50
ARTÍCULO 1: Effect of a tropical tannin-rich plant <i>Lysiloma latisiliquum</i> on adult populations of <i>Haemonchus contortus</i> in sheep. <i>Martínez-Ortíz de Montellano et al., 2010 Veterinary Parasitology 172:283-290</i>	51
ARTÍCULO 2: Scanning electron microscopy of <i>Haemonchus contortus</i> exposed to tannin-rich plants under <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> conditions. <i>Martínez-Ortíz de Montellano et al., enviado a Parasitology International</i>	60

ARTÍCULO 3: Transmission electron microscopy observations of tannin-rich plants effects on <i>Haemonchus contortus</i> . <i>Martínez-Ortíz de Montellano et al., Sin Publicar</i>	74
ARTÍCULO 4: Supplementation of sheep with sainfoin hay or quebracho extract affects differently their population of adult <i>Haemonchus contortus</i> and <i>Trichostrongylus colubriformis</i> . <i>Martínez-Ortíz de Montellano et al., Sin Publicar</i>	90
7. DISCUSIÓN GENERAL	109
8. CONCLUSIONES	124
9. REFERENCIAS	125

ABREVIATURAS

NGI	Nemátodos gastrointestinales
AH	Antihelmíntico (s)
PRT	Plantas Ricas en Taninos
tzalam	<i>Lysiloma latisiliquum</i>
sainfoin	<i>Onobrychis viciifolia</i>
quebracho	<i>Schinopsis spp.</i>
<i>L. latisiliquum</i>	<i>Lysiloma latisiliquum</i>
<i>O. viciifolia</i>	<i>Onobrychis viciifolia</i>
<i>H. contortus</i>	<i>Haemonchus contortus</i>
<i>T. colubriformis</i>	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>
RA	Resistencia Antihelmíntica
L ₃	Larva infectante
LM	Lactonas Macrocíclicas
GABA	Ácido gamma aminobutírico
<i>D. flagrans</i>	<i>Duddingtonia flagrans</i>
pH	Potencial de Hidrógeno
PM	Peso Molecular
kDa	Kilo Dalton
LDL	Lipoproteínas
TH	Taninos Hidrolizables
TC	Taninos Condensados
PPo	Polifenol Oxidasa
MS	Materia Seca
<i>L. pedunculatus</i>	<i>Lotus pedunculatus</i>
<i>L. corniculatus</i>	<i>Lotus corniculatus</i>
CV	Consumo Voluntario
PEG	Polietilenglicol
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ERN	Especies reactivas de nitrógeno

ABREVIATIONS

NGI	Nématodes gastro-intestinaux
AH	Anthelmintic
PRT	Plantes Riches en Tanin
tzalam	<i>Lysiloma latisiliquum</i>
sainfoin	<i>Onobrychis viciifolia</i>
quebracho	<i>Schinopsis spp.</i>
<i>L. latisiliquum</i>	<i>Lysiloma latisiliquum</i>
<i>O. viciifolia</i>	<i>Onobrychis viciifolia</i>
<i>H. contortus</i>	<i>Haemonchus contortus</i>
<i>T. colubriformis</i>	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>
RA	Resistance Anthelmintic
L ₃	Larve infestant
LM	Lactones Macrocycliques
GABA	Gamma aminobutyrique acide
<i>D. flagrans</i>	<i>Duddingtonia flagrans</i>
pH	Potentiel Hydrogène
PM	Poids Moléculaire
kDa	Kilo Dalton
LDL	Lipoprotéines
TH	Tanins Hydrolysables
TC	Tanins Condensés
PPo	Polyphenol Oxydase
MS	Matière Sèche
<i>L. pedunculatus</i>	<i>Lotus pedunculatus</i>
<i>L. corniculatus</i>	<i>Lotus corniculatus</i>
CV	Consommation Volontaire
PEG	Polyéthylène Glycol
ERO	Espèce Réactive d'Oxygène
ERN	Espèce Réactive d'Azote

ABBREVIATIONS

GIN	Gastrointestinal nematodes
AH	Anthelmintic
TRP	Tannin Rich Plants
tzalam	<i>Lysiloma latisiliquum</i>
sainfoin	<i>Onobrychis viciifolia</i>
quebracho	<i>Schinopsis spp.</i>
<i>L. latisiliquum</i>	<i>Lysiloma latisiliquum</i>
<i>O. viciifolia</i>	<i>Onobrychis viciifolia</i>
<i>H. contortus</i>	<i>Haemonchus contortus</i>
<i>T. colubriformis</i>	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>
AR	Anthelmintic Resistance
L ₃	Infective Larvae
LM	Macrocyclic Lactones
GABA	Gamma aminobutyric acid
<i>D. flagrans</i>	<i>Duddingtonia flagrans</i>
pH	Hydrogen Potential
PM	Molecular Weight
kDa	Kilo Dalton
LDL	Lipoproteins
TH	Hydrolyzable Tannins
TC	Condensed Tannins
PPo	Polyphenol Oxidase
MS	Dry Matter
<i>L. pedunculatus</i>	<i>Lotus pedunculatus</i>
<i>L. corniculatus</i>	<i>Lotus corniculatus</i>
CV	Voluntary Intake
PEG	Polyethylene glycol
ERO	Oxygen Reactive Species
ERN	Nitrogen Reactive Species

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia antihelmíntica (RA) de los nemátodos gastrointestinales (NGI) en los rumiantes en pastoreo es actualmente un problema mundial. Esta ha provocado la necesidad de desarrollar un manejo racional, sustentable y ecológico de los NGI en los rebaños de pequeños rumiantes. Una de las posibles opciones para dicho control son los productos naturales. El reto consiste en determinar que tanto se pueden reducir las pérdidas económicas causadas por los parásitos con productos o subproductos naturales. Además, al utilizar este tipo de productos para el control de NGI existe la posibilidad de obtener un valor agregado en la producción animal en el marco de la producción orgánica.

La utilización de plantas con compuestos bioactivos con poder antihelmíntico (AH) contra NGI de rumiantes ha sido sugerida. Ejemplo de esto son las plantas ricas en taninos (PRT). Sin embargo, el mecanismo de acción de dichas plantas, o mejor dicho de sus metabolitos, sobre los NGI aún no ha sido completamente elucidado. La mayoría de los estudios se han centrado en el estadio larvario tres (larva infectante ó L₃). Se sabe que en esta fase del ciclo de vida la motilidad, la funcionalidad y el desenvaine de los NGI se ven afectados (Paolini et al., 2004; Bahuaud et al., 2006; Brunet et al., 2007; Alonso-Díaz et al., 2008ab). A lo anterior se le ha atribuido su eficacia como AH. En el caso de los parásitos adultos es poco lo que se ha investigado. Solo se han reportado daños en cuanto a la viabilidad, la fertilidad y la motilidad (Paolini et al., 2003a; Iqbal et al., 2007). La mayoría de estos reportes son resultados preliminares que no buscan describir el mecanismo de acción de las PRT sobre los NGI. Conocer cómo las PRT afectan de manera directa la biología, la estructura (externa) y ultraestructura (interna) de los parásitos adultos es importante para diseñar programas de control integral que consideren el uso de esas herramientas. Por otra parte, existen estudios que muestran el papel positivo de los taninos sobre la respuesta inmune de los pequeños rumiantes contra los NGI (acción indirecta) (Provenza y Villalba, 2010). La acción indirecta parece estar relacionada con una respuesta celular a nivel de la mucosa en el tracto gastrointestinal (TGI). Esto permite al hospedero defenderse de los NGI. Se desconoce la manera precisa cómo las PRT, y los taninos contenidos en ellas, ejercen el efecto AH sobre los parásitos adultos y si se involucran mecanismos del efecto directo y/o indirecto. Por lo tanto, el objetivo de esta tesis fue determinar el efecto directo (biología, estructura y ultraestructura) y el efecto indirecto (sobre el hospedero de los parásitos) de las plantas ricas en taninos sobre la población adulta de los nemátodos gastrointestinales de los pequeños rumiantes.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 LOS NEMÁTODOS GASTROINTESTINALES DE LOS PEQUEÑOS RUMIANTES.

Los nemátodos son un grupo de helmintos (griego= gusanos), redondos, no segmentados, especies libres y parásitas, cuya morfología es básicamente semejante, aunque éstos presentan adaptaciones a la forma de vida parasitaria. Los nemátodos pertenecen al Reino: Animalia, Phylum: Nematoda, Clases: Adenophorea (Aphasmidia) y Secernetea (Phasmidia), estas clases se dividen en súper familias (ejem. Trichostrongylidae), familias (ejem. Trichostrongylidae) y luego en géneros y especies (ejem. *Haemonchus contortus*) (Simón-Vicente y Simón-Martín, 1999; Lee, 2002). Existen alrededor de 20,000 especies descritas para los diversos géneros, pero aún quedan algunos miles esperando su descripción, la mayoría, especies de vida libre (Pechenik, 1999).

Dentro de la súper familia Trichostrongylidae (Bowman, 2004) y más específicamente en la familia Trichostrongylidae (Simón-Vicente y Simón-Martín, 1999) se encuentran la mayoría de los géneros de los nemátodos parásitos del tracto gastro-intestinal (TGI), comúnmente llamados nemátodos gastrointestinales (NGI), frecuentes en los pequeños rumiantes que pastorean. Los NGI se localizan en diferentes órganos del TGI de los pequeños

rumiantes domésticos y se caracterizan por:

- Ser individuos de pequeña talla (4-35mm)
- Tener una capsula bucal ausente o rudimentaria en comparación a otros nemátodos (Figura 1)
- Los machos poseen una bolsa caudal copulatriz desarrollada (Figura 2)

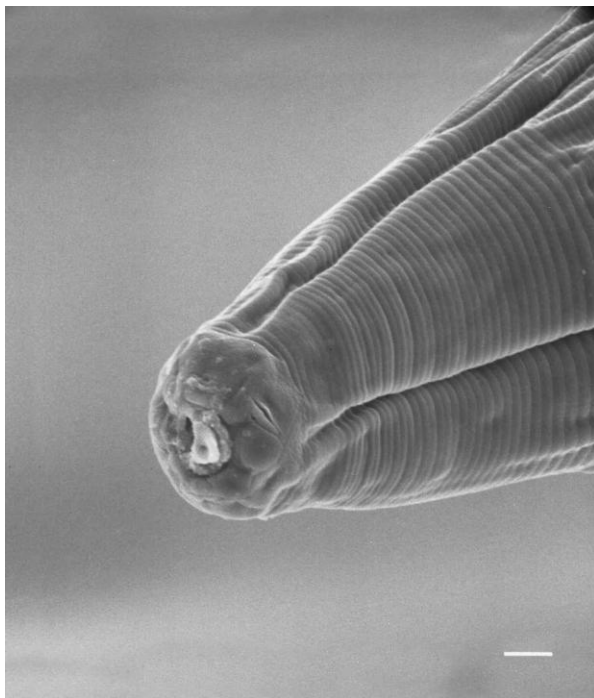


Figura 1. Microfotografía electrónica de barrido de la cápsula bucal rudimentaria de *Haemonchus contortus*. Bar =5µm (Martínez-Ortiz de Montellano, C.).

En el trópico mexicano, dentro de la familia Trychostrongylidae, los NGI de interés son particularmente los del género *Haemonchus* y *Trichostrongylus*, ya que son los más frecuentes y los más diseminados pero

también los más patógenos (Domínguez-Alpizar et al., 1993; Santamaría-Colonia et al., 1995; Rodríguez-Vivas et al., 2001; González-Garduño et al., 2003; Aguilar-Caballero et al., 2005). Por lo tanto, son los que hay que controlar en explotaciones de pequeños rumiantes. Otros géneros en la misma familia como *Cooperia* y *Ostertagia*, están también presentes pero en menor cantidad en los sistemas de producción tropicales (Santamaría-Colonia et al., 1995; González-Garduño et al., 2003; Aguilar-Caballero et al., 2005).



Figura 2. Bolsa caudal copulatriz de un macho del género *Haemonchus* 100x (Torres-Acosta, J.F.J.).

Otros géneros de NGI que afectan a los pequeños rumiantes en el trópico mexicano son *Chabertia* y *Oesophagostomum* (Santamaría-Colonia et al., 1995; Torres-Acosta, 1999; González-Garduño et al., 2003) que son de la familia Chabertiidae (Simón-Vicente y Simón-Martín, 1999). Por último el género *Trichuris* (subclase: Adenophorea, superfamilia: Trichinelloidea; familia: Trichuridae) (Simón-Vicente y Simón-Martín, 1999; Lee, 2002) también ha sido reportado en la producción de pequeños rumiantes en el trópico de México (Santamaría-Colonia et al., 1995; Rodríguez-Vivas et al., 2001).

Estos géneros son identificados por su morfología y su localización en el tubo digestivo de los animales. El poder patógeno de estos nemátodos varía según la biología del parásito y el número de gusanos presentes en el TGI del hospedero. También varía en función de factores condicionantes como la sensibilidad del propio hospedero.

Concretamente las tres principales especies que afectan de manera importante la producción de pequeños rumiantes son *Haemonchus*, *Trichostrongylus* y *Oesophagostomum* (Cuadro 1).

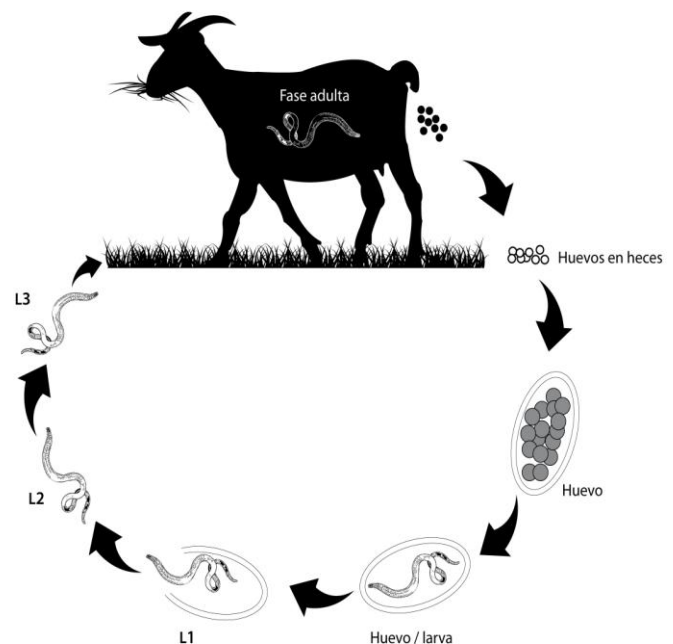
Para fines de esta tesis *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis*, serán las dos especies que se utilizarán como modelo de estudio.

Cuadro 1. Características de las principales especies de nemátodos presentes en los pequeños rumiantes (Jacquet, 1997).

Nemátodo	Localización	Morfología y talla
<i>Haemonchus contortus</i>	Abomaso	Machos : 15-20 mm Hembras : 25-35 mm
<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	Intestino Delgado	Gusanos muy pequeños (4-6 mm de long)
<i>Oesophagostomum columbianum</i> <i>Oesophagostomum venulosum</i>	Intestino Grueso	Gusanos nodulares 8-20 mm

El tipo de ciclo biológico de *H. contortus* y *T. colubriformis* es monoxeno (huevo-larva-adulto) con fase larvaria libre. La infección ocurre como consecuencia de la ingestión de la L₃ o larva infectante (Figura 3).

El *H. contortus* es hematófago. Se nutre de la sangre de su hospedero y puede provocar anemias severas (sobre todo en los animales jóvenes y cuando hay infecciones masivas). Por su parte, *T. colubriformis* es quimiófago, se nutre del contenido del tubo digestivo del animal que parasita. Su patogenia se relaciona con la abrasión que produce en las vellosidades intestinales y por consiguiente ocasiona mala absorción intestinal (Hoste et al., 1997a). Las infestaciones del abomaso y del intestino de los rumiantes implican generalmente una reducción del apetito. Esta disminución del consumo está asociada a la mala absorción y a las modificaciones metabólicas. La mala absorción es principalmente explicada por la alteración de las mucosas y por una disminución del número de células que producen HCl en el abomaso, esto provoca una disminución de la digestión enzimática, perturbaciones severas de la motilidad digestiva y modificaciones en

**Figura 3.** Ciclo biológico de los NGI que parasitan a los pequeños

la permeabilidad de los epitelios. Estas modificaciones cambian la orientación de los nutrientes alrededor de los diferentes lugares donde normalmente son utilizados para el anabolismo con el fin de asegurar la homeostasis sanguínea y tisular del animal, esto es lo que agudiza las pérdidas zootécnicas (Hoste et al., 1997a).

2.2 TRATAMIENTO ANTIHELMINTICO

Los antihelmínticos utilizados para controlar a los NGI son clasificados según su modo de acción y se agrupan en tres familias principales de antihelmínticos de amplio espectro: los benzimidazoles y pro-benzimidazoles; el imidiazotiazol (levamisol) y tetrahidropirimidinas (pirantel, morantel) y por último las lactonas macrocíclicas (avermectinas y milbemicinas).

Benzimidazoles y Probenzimidazoles

Estas moléculas actúan sobre los microtúbulos de las células intestinales y tegumentarias del parásito y se fijan directamente sobre las moléculas de β -tubulina de los parásitos bloqueando así su polimerización y evitando la formación de los microtúbulos (Borgers y De Nollin, 1975; Borgers et al., 1975a; Zintz y Frank, 1982; Mottier y Lanusse, 2001; Mottier et al., 2006).

Los benzimidazoles y los probenzimidazoles actúan sobre los NGI y los parásitos respiratorios. Algunos de ellos (fenbendazol, oxfendazol, albendazol) tienen cierta actividad sobre los cestodos (Borgers et al., 1975b; Mottier et al., 2006) y trematodos (Mottier et al., 2006; Meany et al., 2007).

Imidiazotiazol y Tetrahidropirimidinas

El imidiazotiazol (levamisol) y las tetrahidropirimidinas (pirantel, morantel), están agrupados en la misma clasificación por que tienen el mismo modo de acción, pero sus moléculas son diferentes. Actúan rápido y selectivamente como antagonista colinérgico sobre receptores nicotínicos y extra sinápticos de las membranas de las células musculares de los nemátodos (Mottier et al., 2006). Provocan una contracción muscular al afectar la permeabilidad de las membranas de las células musculares, causando parálisis y muerte del nemátodo.

Lactonas Macroclílicas

Las lactonas macroclílicas (LM) son moléculas que paralizan la faringe, los músculos del cuerpo y del útero de los NGI (Vercruyssen y Rew, 2002). Las LM actúan aumentando la permeabilidad de los canales de cloro de las células musculares de dichos órganos (Brard y Chartier, 1997). Otra acción de las LM es sobre los receptores antagonistas del ácido gamma aminobutírico (GABA) que es un neurotransmisor, provocando una hyperpolarización de las membranas somáticas musculares que se traduce en parálisis muscular (Brard y Chartier, 1997; Prichard, 2002).

2.3 LA RESISTENCIA ANTIHELMÍNTICA

Una población quimiorresistente es definida desde 1957 por la OMS (Organización Mundial de la Salud), como una población de parásitos que adquieren la capacidad de resistir a concentraciones de desparasitantes normalmente letales para los individuos de esa especie.

La determinación de esta resistencia es de naturaleza genética, medida por un incremento en la frecuencia de expresión de un carácter hereditario que le confiere a ciertos parásitos de una población dicha resistencia en relación a la población susceptible de una misma especie (Mottier y Lanusse, 2001). Para los NGI, estos fenómenos de quimiorresistencia fueron conocidos a principios de los años 70. En diferentes países, los casos aislados de resistencia a todas las moléculas actualmente comercializadas comienzan a ser reportadas (Van Wyk et al., 1999). La resistencia antihelmíntica (RA) ha sido descrita en la mayoría de las especies de nemátodos de los rumiantes. El *H. contortus* es la especie señalada como la que presenta más el fenómeno de resistencia (Jackson y Coop, 2000; Kaplan, 2004). Muchos factores explican la aparición de la resistencia en el seno de las poblaciones de los parásitos. Estos factores son ligados principalmente a la modalidad del uso de estos tratamientos que son la primera causa del aumento de la presión de selección (Jackson y Coop, 2000). La frecuencia continua y desmesurada del uso de desparasitantes en las unidades de producción, es una de las primeras causas evocadas por explicar el desarrollo de la resistencia (Kaplan, 2004). Los errores en la utilización de estas moléculas principalmente de benzimidazoles, como la sobre dosis, ha sido igualmente identificada como una causa en la aparición de la resistencia en la población parasitaria, particularmente en las cabras (Chartier y Hoste, 2004).

En Latinoamérica, en países como Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay se reportó la presencia de NGI resistentes a las ivermectinas, lo que condujo a problemas de producción, desapareciendo así rebaños en esas regiones (FAO, 2003). En México, se ha reportado la existencia de resistencia antihelmíntica (Cuadro 2), principalmente a benzimidazoles y levamisol (Torres-Acosta et al., 2003abc; Torres-Acosta et al., 2005; Torres-Acosta et al., 2007) y a ivermectinas (González-Garduño et al., 2003; Montalvo-Aguilar et al., 2006).

Cuadro 2. Detección de resistencia antihelmíntica en rebaños ovinos y caprinos de las regiones Noroeste y Sureste de México.

Antihelmíntico	Especie NGI	Número de Rebaños	Especie	Región	Autores
Benzimidazol	<i>Haemonchus</i>	39*	ovinos	Sureste	Torres-Acosta et al., 2003a
	<i>Haemonchus</i>	12*	ovinos	Sureste	Torres-Acosta et al., 2003b
	<i>Haemonchus</i>	1	caprinos	Sureste	Torres-Acosta et al., 2003c
	<i>Haemonchus</i>	De 19 el 58%	caprinos	Sureste	Torres-Acosta et al., 2005
	<i>Trichostrongylus</i>	36.6%			
	<i>Oesophagostomum</i>	36.6%			
	<i>Haemonchus</i> <i>Teladorsagia</i>	1**	ovinos	Noroeste	Montalvo-Aguilar et al., 2006 Torres-Acosta et al., 2007
Levamisol	<i>Haemonchus</i> <i>Trichostrongylus</i> <i>Oesophagostomum</i>	39	ovinos	Sureste	Torres-Acosta et al., 2003a
	<i>Haemonchus</i> <i>Trichostrongylus</i> <i>Oesophagostomum</i>	12	ovinos	Sureste	Torres-Acosta et al., 2003b
	<i>Trichostrongylus</i>	1	caprinos	Sureste	Torres-Acosta et al., 2003c
	<i>Haemonchus</i> <i>Ostertagia</i> <i>Oesophagostomum</i>	3	ovinos	Sureste	González-Garduño et al., 2003
LM (ivermectina)	<i>Haemonchus</i> <i>Teladorsagia</i>	De 20 el 20%	ovinos	Noroeste	Montalvo-Aguilar et al., 2006

*Sospecha de resistencia múltiple a benzimidazoles e ivermectina.

**Sospechosos

2.4 METODOS ALTERNATIVOS A LOS ANTIHELMINTICOS CONVENCIONALES

Dada la disminución de la eficacia de las drogas antihelmínticas, muchos esfuerzos han sido desarrollados para encontrar los métodos alternativos de lucha compatible con un control más durable de este parasitismo (Larsen, 1999; Chandrawathani et al., 2003; Hoste et al.,

2006; Ketzis et al., 2006). Estos métodos descansan sobre tres principales principios: a) aquellos que aumenten la resistencia del hospedero, b) los que agoten la fuente de contaminación, y c) los que eliminen a los nemátodos (Hoste et al., 1997b).

a) Aumentar la resistencia o resiliencia del huésped

☉ Una vacuna contra *H. contortus* (Smith, 1999; Ketzis et al., 2006) está en proceso de obtener la patente del WIPO (World Intellectual Property Organization). Si bien el desarrollo de esta vacuna ha tenido numerables limitantes sobre todo por la dificultad tecnológica de la producción en masa de antígenos recombinantes, hoy ya es posible desarrollar una vacuna comercial (Smith, 2008; LeJambre et al., 2008). Esta nueva vacuna no depende de la producción de antígenos recombinantes sino que usa directamente antígenos nativos de parásitos que son colectados de animales (Cachat et al., 2010; Smith y Taylor, 2009). El otro problema que representaba la vacuna, es que en países en desarrollo el precio pudiera resultar elevado, ahora, puede verse desde otra perspectiva en la cual este método puede ser viable ya que los antígenos suficientemente viables han sido ya encontrados para *Haemonchus* (Smith, 2008) y para *Ostertagia* (Meyvis et al., 2007; Smith, 2008). En cuanto a los otros géneros de NGI, aún queda mucho campo para investigar sobre todo en los géneros de *Teladorsagia* y *Trichostrongylus* (Smith, 2008).

☉ La resistencia genética, basada en la existencia de un componente genético en los rumiantes ya sea entre razas o entre individuos de la misma raza (Jackson y Miller, 2006; Torres-Acosta y Hoste., 2008). El uso de medidas fenotípicas para la carga parasitaria puede resultar en tener animales resistentes (Hunt et al., 2008). Los marcadores basados en DNA para la resistencia parasitaria, pueden ser por lo tanto potencialmente identificados por que la resistencia parasitaria tiene un componente genético significativo que puede ser distinguido de los componentes ambientales variantes de esta característica (Hunt et al., 2008). Estos marcadores genéticos deberían ser incluidos en los sistemas de producción bajo un programa de selección estricto y focalizado para conferir los genes de resistencia a los NGI (Benhnke et al., 2009). El rápido desarrollo de la tecnología genética de detección de este carácter de resistencia, ha permitido avances considerables, pero aún se está buscando la manera de integrar de alguna manera estos marcadores dentro del manejo de producción de los rebaños (Jackson et al., 2009).

⊙ El mejoramiento de la ración del hospedero permite una mejor respuesta del individuo ante una infestación parasitaria (resiliencia) (Aguilar et al., 2005; Coop y Kyriazakis, 2001; Hoste et al., 2005; Ketzis et al., 2006; Torres-Acosta et al., 2006) y en ciertos casos puede mejorar también la respuesta inmune (Hoste et al., 2008). Este mecanismo consiste en aportar los nutrientes necesarios para realizar la reconstrucción de los tejidos dañados, la producción de células y materiales de defensa (como moco) y finalmente proveer nutrientes para los procesos anabólicos de hueso, musculo, etc. (Coop y Holmes, 1996; Coop y Kiriazakys, 2001).

b) Agotar la fuente de contaminación

⊙ La rotación de potreros para disminuir la carga parasitaria (larvas L₃), esto tiene como objetivo disminuir las infestaciones de las parcelas a fin de reducir al máximo las posibilidades de contacto del hospedero y las L₃ (Barger et al., 1994; Barger, 1999). Ningún estudio parecido ha sido publicado en México.

⊙ Los hongos nematófagos como *Duddingtonia flagrans* (Larsen, 1999 Paraud et al., 2005). En México se tiene una cepa local y se está evaluando como método de control biológico. La eficacia de *D. flagrans* está relacionada con la etapa de desarrollo del parásito y con la densidad de larvas presentes para estimular la capacidad predadora, así en este estudio con proporciones crecientes de huevos por clamidosporas se obtuvieron reducciones de 37 a 82% y con larvas infectantes las reducciones fueron de 37 a 92%. La cantidad de larvas disminuyó conforme aumentó la cantidad de clamidosporas hasta la relación de 10 clamidosporas por cada huevo (Ojeda-Robertos et al., 2005; 2008).

c) Eliminación de los NGL.

⊙ La utilización racional de los antihelmínticos, particularmente por la aplicación de tratamientos específicos (Van Wyk y Bath, 2002; Hoste et al., 2002; Van Wyk et al., 2006).

Sólo los animales los más sensibles a las infecciones parasitarias reciben un tratamiento antihelmíntico, lo que permite controlar el parasitismo, evitando así una presión de selección elevada sobre los nemátodos, retardando la resistencia a los antihelmínticos.

⊙ Los tratamientos selectivos, según la evaluación clínica de anemia con el sistema FAMACHA© (Van Wyk y Bath, 2002) y la medición de la condición corporal. Importantes resultados han sido reportados en Yucatán, México (Torres-Acosta et al., 2005; Van Wyk et al., 2006, Canul-Ku et al., 2008), utilizando un sistema que se basa en la toma de muestras de

animales con valores altos de FAMACHA© (anémicos) y/o baja condición corporal tratando solo a los animales que tienen parásitos en cantidades elevadas.

☉ Agujas de óxido de cobre (COPINOX©). Las agujas se dosifican en unas cápsulas de manera oral, éstas agujas se sedimentan en el abomaso y se cree que el pH ácido induce la liberación continua de iones de óxido de cobre. El cobre cuando se libera tiene efecto antihelmíntico contra especies abomasales de NGI pero su mecanismo de acción permanece desconocido. (Bang et al., 1990; Chartier et al., 2000; Knox, 2002). Su efecto sobre *H. contortus* y *T. colubriformis* en caprinos en Yucatán ha sido demostrado, las agujas disminuyeron la carga parasitaria y afectaron la fecundidad de las hembras (Martínez-Ortiz-de-Montellano et al., 2007).

☉ Plantas Bioactivas, utilizadas como tratamientos fitoterapéuticos o nutraceuticos por sus propiedades antihelmínticas (Githiori et al., 2006; Ketzis et al., 2006; Rochfort et al., 2008). Los principales componentes de plantas que se han reportado con actividad antihelmíntica contra NGI son: Terpenos, Aromáticos, Alcaloides, Saponinas, Antraquinonas, Enzimas, Ácidos grasos y Taninos (Rochfort et al., 2008). En la regiones tropicales, las plantas representan aún lo esencial de la farmacopea veterinaria, en particular como elementos antihelmínticos (Houzangbe-Adote, 2001). En México se conocen diferentes plantas que tienen cierto efecto antihelmíntico. La eficacia antihelmíntica de estas plantas, principalmente aquellas que son ricas en taninos condensados, han comenzado a ser estudiadas (Alonso-Díaz et al., 2008bc; Brunet et al., 2008a). El presente trabajo se desarrolló con los antecedentes de estos estudios y bajo la perspectiva de utilizar las plantas ricas en taninos (PRT) como antihelmíntico no convencional.

2.5 TANINOS

El término “tanino” se deriva de la palabra *tanning* que se refiere a la preservación o curtido de pieles (Waghorn, 2008). Son un conjunto de componentes naturales de origen vegetal capaces de vincularse principalmente con las proteínas y en menos intensidad con iones de metal, aminoácidos y polisacáridos (Aoki et al., 2000; Schofield, 2001; Makkar et al., 2007; Rochfort et al., 2008). Los taninos forman parte de la fuerte interacción bioquímica

entre la mayoría de las plantas contra los herbívoros (Eck et al., 2001; Heil et al., 2002; Provenza et al., 2003), las bacterias, hongos e insectos (Eck et al., 2001; Heil et al., 2002).

2.5.1 Propiedades fisicoquímicas

Solubilidad

La solubilidad de los taninos en el agua depende del peso molecular y el grado de polimerización (Jean-Blain, 1998; Bruneton, 1999). Los taninos son igualmente solubles en acetona y alcohol, por esta razón la extracción de los taninos es normalmente a través de una solución acetona-agua o metanol-agua (Makkar, 2000).

Complejo tanino-proteína

Los taninos se fijan a casi la totalidad de las proteínas, formando así complejos insolubles al pH fisiológico (pH 7.4) (Zimmer y Cordesse, 1996). Además de formar vínculos directos con las proteínas, los taninos establecen “puentes” entre las proteínas (formando puentes de hidrógeno entre sus grupos hidroxilo y los sitios electronegativos de la proteína) lo que produce la precipitación de las mismas (Zimmer y Cordesse, 1996; Bruneton, 1999).

No obstante, el grado de unión entre los taninos y las proteínas depende de la estructura y de la configuración de las dos moléculas implicadas (Mueller-Harvey y Mc Allan, 1992; Waterman, 1999; Poncet-Legrand et al., 2006). En cuanto a los taninos, un peso molecular (PM) alto y un impedimento estérico, no le permitiría fijarse a las proteínas (Hagerman, 1992; Mueller-Harvey y Mc Allan, 1992; Jean-Blain, 1998). La unión de la proteína depende igualmente de la naturaleza química de los taninos (Bravo, 1998; Feucht y Treutter, 1999; Waterman, 1999; Bennick, 2002). En el caso de las proteínas, los taninos son muy afines a las proteínas de conformación abierta, de un PM superior a los 20kDa y ricas en aminoácidos como la prolina y la hidroxiprolina (Hagerman, 1992; Zimmer y Cordesse, 1996; Jean-Blain, 1998; Clauss et al., 2005). Además, la precipitación de las proteínas se ve favorecida en pH isoelectrico de las proteínas implicadas (Hagerman, 1992; Mueller-Harvey y Mc Allan, 1992; Zimmer y Cordesse, 1996).

En función de las condiciones del medio, tales como el pH, la temperatura, la fuerza iónica o la presencia de moléculas con las que pueda competir la proteína, dos tipos de

complejos se pueden distinguir: los complejos reversibles y los irreversibles. Un complejo reversible:

1) En condiciones no oxidantes y alrededor de un pH de 7, las interacciones entre los taninos y las proteínas se establecen como un enlace reversible (enlaces hidrógenos o de interacciones hidrofóbicas) (Mueller-Harvey y Mc Allan, 1992; Zimmer y Cordesse, 1996; Jean-Blain, 1998; Bruneton, 1999; Bennick, 2002; Hagerman, 2002; Poncet-Legrand et al., 2006).

2) Un complejo irreversible: En condiciones de estrés oxidativo, las funciones fenólicas de los taninos tienen la tendencia a auto oxidarse en O-quinonas. Estos últimos interactúan con las proteínas por enlaces covalentes (compartiendo iones por electronegatividad débil sin poder transferir esos iones) irreversibles (Bruneton, 1999; Feucht y Treutter, 1999).

Así, entonces el pH óptimo para la vinculación es desde un pH3.5 hasta un pH7.0 (Jones y Mangan, 1977). Es importante considerar que los taninos pueden de igual manera formar complejos con los ácidos nucleicos (Mueller-Harvey y Mc Allan, 1992).

2.5.2 Propiedades biológicas

La propiedad biológica de los taninos la mayoría de los casos se resume en una visión de los taninos como nutraceuticos. El término de “Nutracéutico” fue introducido por Stephen DeFelice (1979, citado por Lin y Weng, 2006). Este autor lo definió como, “un alimento o parte de un alimento que provee un beneficio médico o para la salud, incluyendo la prevención y el tratamiento de una enfermedad”. Dillard y German (2000, citados por Lin y Weng, 2006), definen que un nutraceutico es “cualquier extracto no toxico de un alimento que científicamente da un beneficio para la salud proporcionando el tratamiento y la prevención de enfermedad”. Los mejores ingredientes nutraceuticos activos en las plantas son los flavonoides (Lin y Weng, 2006) y entre ellos los taninos han sido estudiado por su potencial actividad antihelmíntica.

Actividad anti-oxidante

Numerosos taninos presentan propiedades anti-oxidantes capturando los radicales libres o aún mejor inactivando los iones precursores de la oxidación (Bruneton, 1999; Feucht y

Treutter, 1999; Lin y Weng, 2006; Lim et al., 2007). Venereo-Gutiérrez (2002), establece que las flavonoides actúan como antioxidantes, neutralizando el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), que es la forma altamente reactiva y más activa del oxígeno. Gracias a su estructura fenólica, que tiene carácter nucleófilo fuerte (reacciona cediendo un par de electrones libres), los taninos son excelentes barredores de radicales libres. Los radicales libres, como el hierro y el cobre, de forma libre son químicamente inestables y altamente reactivos. Ellos atacan el ADN y alteran el proceso de replicación, causando mutaciones cancerígenas. Así, las actividades antimutagénico y contra el cáncer han sido atribuidos a algunos taninos, debido a sus propiedades antioxidantes (Figura 4) (Chung et al., 1998; Jung y Ellis, 2001; Richelle et al., 2001; Lin y Weng, 2006).

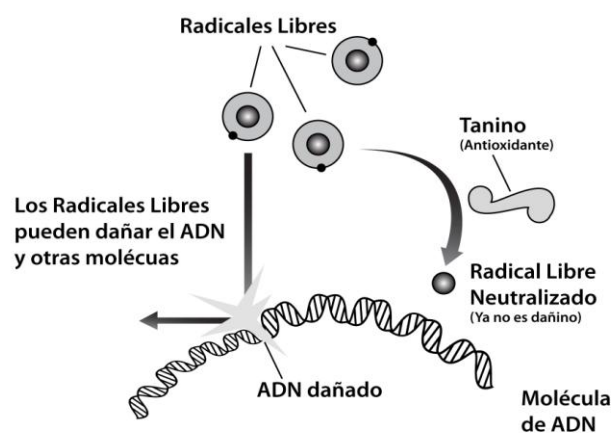


Figura 4. Esquema que muestra la función antioxidante de un tanino.

Actividad antiséptica

La actividad antiséptica de los taninos es una de las más simples y más importantes actividades reportadas (Chung et al., 1998; Bruneton, 1999; Rochfort et al., 2008). Existen taninos que presentan efectos antimicrobianos (Chung et al., 1998; Hatano et al., 2005; Song et al., 2006). Algunas especies de bacteria como *Peptostreptococcus anaerobius* son extremadamente sensibles a los taninos condensados (Rochfort et al., 2008). El efecto sobre algunas bacterias ruminales es que los taninos forman complejos con la capa de polímeros

celulares, penetrando a la célula por la pared celular en concentraciones suficientes para actuar sobre uno o más organelos y para inhibir selectivamente la síntesis de la pared celular (Jones et al., 1994). También los taninos funcionan como antifúngicos (Baba-Moussa et al., 1999; Bruneton, 1999) al provocar, la inhibición de enzimas extracelulares, la privación de sustrato, la inhibición de la fosforilación oxidativa, así como los mecanismos que implican la privación de hierro (Conegero-Sanches et al., 2005). Y como antivirales (Chung et al., 1998; Yamaguchi et al., 2002; Song et al., 2005; Rochfort et al., 2008) cuando los taninos inhiben la adsorción de los virus hacia la célula (Fukuchi et al., 1989). Sin embargo, son limitadas las actuales aplicaciones terapéuticas (Bruneton, 1999).

Prevención de enfermedades cardiovasculares

Dietas altas en flavonoides son eficaces para enfermedades, particularmente las cardiovasculares, los taninos del jugo de uva o el vino tienen efectos preventivos de estas enfermedades. Este efecto es descrito como “French Paradox” (paradoja francesa) (Bruneton, 1999). La potente capacidad de captación de radicales peroxil de los flavonoides, contribuye a inhibir la peroxidación lipídica y oxidación de las lipoproteínas (LDL), factores implicados en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares (Lin y Weng, 2006).

2.5.3 Clasificación de los Taninos.

Los taninos tradicionalmente se clasifican por su biología en taninos hidrolizables y taninos condensados o proantocianidinas. Sin embargo, esta clasificación es convencional y un poco simplista.

Los **taninos hidrolizables** (TH), consisten en un núcleo central de carbohidrato al cual se unen ácidos fenólicos carboxílicos mediante enlaces éster. Estos últimos son ésteres de azúcares de ácidos gálico o elágico (Figura 5). Estos taninos pueden ser fácilmente hidrolizados con ácidos, álcalis, agua caliente o enzimas (Makkar, 2006). A los TH se les atribuyen los principales efectos negativos en los rumiantes que los consuman, provocando intoxicación, que afecta hígado y riñones, pudiendo ocasionar la muerte (Waghorn y McNabb, 2003). Sin embargo, también se ha reportado que los TH mejoran la absorción de nutrientes (Lowry et al., 1996), tienen amplia actividad biológica y farmacológica (Okuda,

2005) e incluso son más potentes como agentes biológicos (unidad masa) que los taninos condensados (Haslam, 1974 citado por Shoefield, 2001).

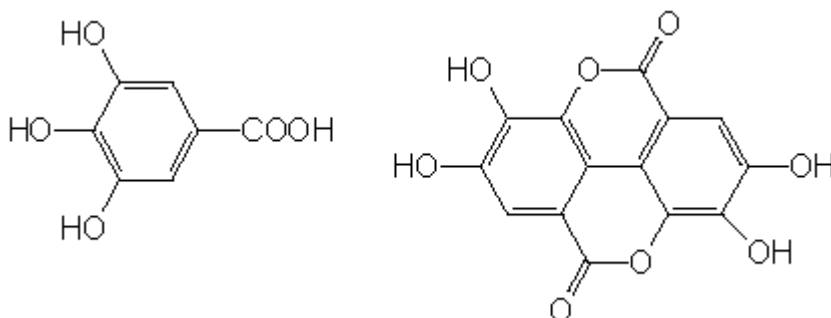


Figura 5. Estructuras base de un tanino hidrolizable (modificado de Perron y Brumaghim, 2009).

Los **taninos condensados** (TC), son polímeros resultantes de la condensación de flavonoles-3 (polifenoles). Los flavonoles forman flavonoides. Los flavonoides son componentes naturales de las plantas. Más de 4000 flavonoides han sido aislados de plantas briofitas, pteridofitas, gimnospermas y angiospermas. La mayoría de las plantas vasculares contienen flavonoides (Aoki et al., 2000). Los flavonoides se clasifican en diversas subclases como los chalconas, flavanonas, flavones, dihidroflavonoles, flavonoles, antocianinas y proantocianidinas (unidades de catequinas que forman taninos condensados). Los flavonoides pueden sufrir modificaciones en su estructura formando así otros compuestos como los isoflavones y los neoflavones, formando ambos parte de los flavonoides (Figura 6).

Los TC consisten en oligómeros de dos o más flavan-3-oles, tales como la catequina, epicatequina o la correspondiente galocatequina. Dependiendo de la estructura química de la unidad monométrica, en particular del número de radicales hidroxilo, son clasificados en cuatro grupos, los dos más comunes son la procianidinas y las prodelfinidinas (Makkar, 2006). La combinación de los grupos OH y H con los radicales de la molécula química, producen una gran variedad de estructuras químicas que, a su vez, afectan las propiedades físicas y biológicas de los TC (Min y Hart, 2002).

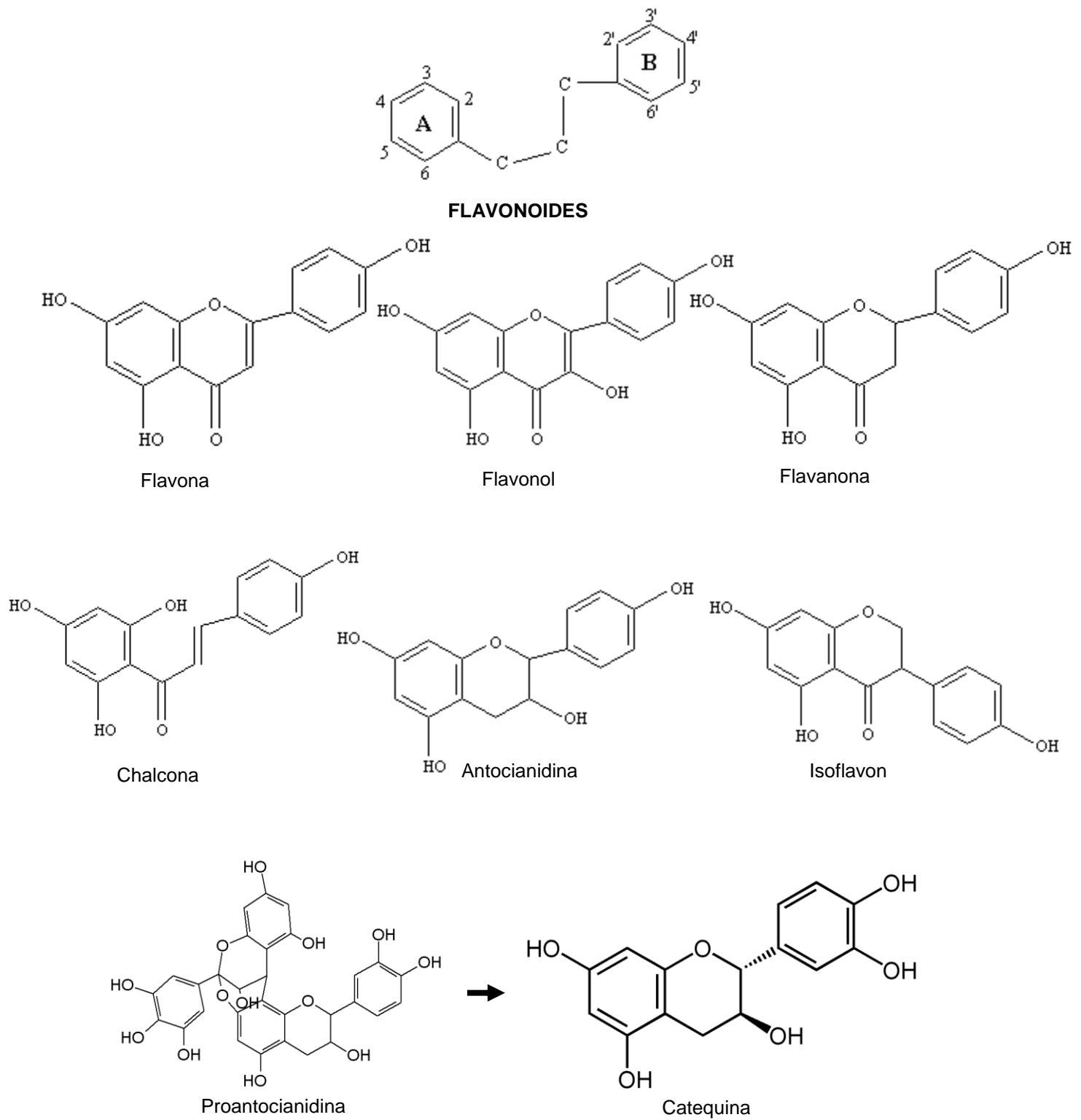


Figura 6. Estructura química de subclases de flavonoides biológicamente activos (modificado de Aoki et al., 2000).

Síntesis de los taninos condensados

La formación de los TC implica flavan-3,4-diols que son moléculas muy reactivas. Estos flavan-3,4-diols pasan carbocationes que reaccionan sobre los carbonos nucleofílicos en la posición 8 ó 6 de un flavan-3-ol (Bruneton, 1999; Schofield et al., 2001). Biogénicamente, los flavan-3-ols y los TC son parte de la vía metabólica de un fenilpropanoide (Weisshaar y Jenkins, 1998), que conducen igualmente a la síntesis de flavonoides (Mueller-Harvey y Mc Allan, 1992; Bruneton, 1999). Sin embargo, sí bien la biosíntesis de los flavonoides es conocida, las etapas de condensación y de polimerización de los TC aún nos son del todo bien definidas (Mueller-Harvey y Mc Allan, 1992; Hagerman, 2002). Los precursores de la síntesis de flavonoides son la fenilalanina y el acetato (Mueller-Harvey y Mc Allan, 1992). Las primeras etapas de la síntesis de los flavan-3-ols son comúnmente las antocianinas y tendrán lugar en el citoplasma, ahora la maduración y la polimerización de los TC tendrá lugar en la vacuola (Figura 8) de las células vegetales (Aerts et al., 1999; Waghorn, 2008).

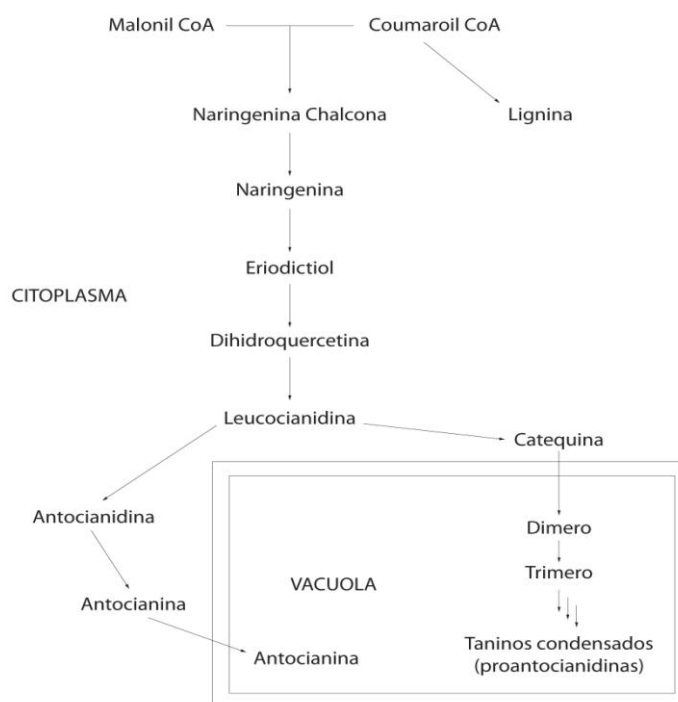


Figura 8. Síntesis de los taninos condensados (Aerts et al., 1999).

2.5.4 Plantas Ricas en Taninos (PRT)

Ciertas especies de las familias Pinaceae (pino), de Fagaceae (roble y castaño), de Rosidae (acacia) y de Rosaceae (manzano). Entre las Fabaceae (leguminosas), ciertas especies de leguminosas forrajeras, como el sainfoin (*Onobrychis viciifolia*), la sulla (*Hedysarium coronarium*) y los lotos (*Lotus pedunculatus* y *Lotus corniculatus*), contienen los TC en cantidad significativa (2 a 5% de la MS). Por el contrario las plantas herbáceas de la familia Poaceae, como el « rye-grass » (*Lolium perenne* L.) u otras representantes de la familia de las leguminosas como la alfalfa (*Medicago sativa* L.) y el trébol blanco (*Trifolium repens* L.), presentan cantidades muy bajas y no detectables de TC (Bruneton, 1999; Aerts et al., 1999). Las plantas tropicales, también son ricas en taninos como los géneros de *Acacia* (Kahiya et al., 2003; Akkari et al., 2007; 2008; Cenci et al., 2007; Minho et al., 2008; Alonso-Díaz., 2008bc; Max et al., 2009), otras plantas forrajeras como *Piscidia piscipula* (Alonso-Díaz., 2008bc) y *Lysiloma latisiliquum*, (Brunet et al., 2008a; Alonso-Díaz., 2008bc).

Papel de los taninos en las plantas

Los taninos juegan un papel en la defensa de las plantas contra las agresiones del medio en dónde se encuentran. La síntesis de los taninos es un mecanismo de defensa de las plantas en contra de los ataques de los fitopatógenos. Los taninos al enlazarse fuertemente con las proteínas y formando los complejos, desencadenan en la planta un mecanismo químico de defensa ante cualquier agresión (Barry y McNabb, 1999). Una acumulación de los taninos ha sido observada en las zonas de invasión de la planta por bacterias, por hongos o por nemátodos, lo que inhibe el desarrollo de los mismos (Feucht y Treutter, 1999; Collingborn et al., 2000). Los taninos son también una medida de defensa contra las agresiones de predadores como los insectos y los mamíferos herbívoros (Mueller-Harvey y Mc Allan, 1992; Woodward y Coppock, 1995; Feucht et al., 1997). Se ha demostrado que la ingestión de los taninos afecta la integridad del tubo digestivo de los insectos herbívoros (Ayres et al., 1997; Granados-Sánchez et al., 2008). Camarena-Gutiérrez (2009), establece que la alimentación de los insectos dispara la expresión de proteínas defensivas de la planta ejerciendo efecto directo sobre los atacantes. Los inhibidores de proteinasas dañan varias clases de proteasas digestivas

en el tracto digestivo del insecto, esto desencadena deficiencia de aminoácidos que afectan negativamente el crecimiento y desarrollo del herbívoro.

Otra acción directa es la producción de enzimas que rompen la fisiología digestiva del insecto y otros aspectos del consumo del alimento. Entre éstas enzimas esta la polifenol oxidasa (PPO) (Camarena-Gutiérrez, 2009). Esta participa activamente en la polimerización de los taninos condensados y la formación de los complejos tanino-proteína (Taiz y Zeiger, 2007). La PPO sale de los cloroplastos y va a reaccionar con los taninos que son liberados de las vacuolas, sobre todo cuando las plantas son lesionadas por el proceso de masticación de cualquier herbívoro, desencadenando principalmente efectos oxidativos sobre el sistema digestivo (Casado-Vela, 2004; Camarena-Gutiérrez, 2009). Algunos metabolitos secundarios de las plantas, actúan sobre el sistema nervioso de los insectos herbívoros, moluscos o mamíferos (Granados-Sánchez et al., 2008). Además, la sola presencia de los taninos hace a las plantas menos apetitosas para los mamíferos herbívoros por la sensación de astringencia después de haberlas consumido. Esta astringencia provoca que el animal deje de comer protegiéndose así las plantas de una depredación excesiva (Jean-Blain, 1998; Bennick, 2002). Sin embargo, existen herbívoros que han desarrollado el mecanismo de evitar los efectos de estas defensas químicas. Tanto la morfología como la fisiología de los vertebrados e invertebrados, están adaptados para albergar simbiosis microbianos que aumenten la digestibilidad reduciendo los polímeros de los tejidos vegetales y que ayuden a degradar los metabolitos secundarios de las plantas (Granados-Sánchez et al., 2008). Recientes estudios han demostrado que el consumo de PRT por caprinos (Alonso-Díaz et al., 2008a) y por ovinos (Alonso-Díaz et al., 2009) no causa ningún efecto negativo en estos rumiantes, lo que sugiere una adaptación planta-herbívoro. Más recientemente se reportó la presencia de saliva rica en proteínas bloqueadoras de taninos en pequeños rumiantes criados en zonas con gran abundancia de PRT (Alonso-Díaz et al., 2010).

Localización de los taninos en la planta

En los vegetales, todos los órganos pueden contener taninos: las raíces, los rizomas, corteza, madera, hojas, flores, frutos y granos. Sin embargo, la localización de los taninos varía entre los órganos. Los taninos están mayormente almacenados en el tejido epidérmico y

sub-epidérmico, pero pueden estar también presentes en el pericarpio de los frutos y raíces. En una misma especie vegetal que sintetiza los dos tipos de taninos, hay una distribución de TH y de TC en los órganos de las plantas diferente (Jean-Blain, 1998). Del mismo modo, a nivel celular, los TH están mayormente presentes en las paredes celulares y los espacios celulares, mientras que los TC están sobre todo almacenados en las vacuolas intracelulares bajo su forma libre y en proporción variable, ligado a fibras (como la lignina) de las paredes celulares o a las proteínas celulares (Terrill et al., 1992b; Frutos et al., 2004).

Contenido de taninos en una planta

El contenido de taninos de una planta depende de varios factores intrínsecos, tales como las especies y la variedad, la parte o etapa de la planta, y extrínsecos, como el clima, el estrés o la depredación del suelo dada por la presión de los herbívoros (Mueller-Harvey y Mc Allan, 1992; Jean-Blain, 1998; Norton, 1999; Waterman, 1999).

- Diferentes órganos de la planta muestran diferentes niveles de taninos. Las concentraciones más altas se midieron en las frutas, flores y hojas, y las más bajas en los tallos. Por ejemplo, se ha medido como las hojas, flores y tallos del sainfoin contienen, respectivamente, 0,31%, 0,30% y 0,07% de taninos (Barrau, 2005).
- Dentro de la misma familia botánica, especies de plantas difieren en contenido y la naturaleza de los taninos. Para tomar un ejemplo de las leguminosas, la concentración de TC es enormemente diferente en el trébol (0.3g TC/Kg MS), el sainfoin (30g TC/Kg MS) (Koupai-Abyazani et al., 1993; Marais et al., 2000), y la sulla (35g TC/Kg MS) (Hoskin et al., 2000).
- Dentro del mismo género, también existen diferencias entre especies. Foo et al. (1997), midieron la cantidad de TC entre los lotos *L. pedunculatus* (77g TC/Kg MS) y *L. corniculatus* (48g TC/Kg MS) (Foo et al., 1997). Finalmente, las variaciones de concentración de los TC han sido observadas entre las diversas variedades de una misma especie de loto (*L. corniculatus*) (Hedqvist et al., 2000) o de sainfoin (*O. viciifolia*) (Barrau et al., 2005).

- Dentro de una misma especie en un mismo sitio geográfico, existe una variabilidad significativa en el contenido de taninos del follaje entre diferentes individuos (Alonso-Díaz et al., 2010).
- Para una especie determinada, la fase vegetativa también influye en el nivel de taninos (Jean-Blain, 1998). En general, durante el crecimiento de la vegetación, hay una dilución de los taninos. En las hojas, la cantidad y calidad de los taninos cambia durante la maduración. Del mismo modo, en el fruto el contenido de taninos normalmente disminuye. Por ejemplo, la maduración de las hojas de roble, entre abril y septiembre, es acompañado por cambios en el contenido y la estructura (por el aumento del grado de polimerización) de los taninos (Makkar et al., 1991). Un proceso similar se ha observado en las leguminosas. Así, el contenido de TC del sainfoin varía de 27 a 16 g/Kg MS, durante la fase de crecimiento (Borreani et al., 2003). La calidad de los TC varía dependiendo de la etapa vegetativa (Koupai-Abyazani et al., 1993). Durante la maduración de las hojas de sainfoin, las variaciones en el grado de polimerización (5 a 8.5) y el porcentaje de prodelfinidinas (60 a 95%) han sido observados (Koupai Abyazani et al., 1993).

Condiciones medioambientales

La síntesis de los taninos es generalmente mayor en respuesta al estrés ambiental, cualquiera que sea su origen (estrés hídrico, agotamiento del suelo o demasiada luz solar (Bennick, 2002). Por otra parte, la proporción de TC en forma libre o unido a fibra o proteína, está también bajo la influencia de las condiciones climáticas y el estrés de nutrientes (Frutos et al., 2004). Así, después de un largo período de sequía, Feucht et al. (1997), observaron un aumento de 7.4 veces el contenido de flavan-3-ols en las hojas amarillas de la haya en comparación con las hojas verdes. Recientemente, un estudio de las uvas Cabernet Franc (*Vitis vinifera L.*) ha mostrado también que el contenido de flavan-3-ols y la distribución de los TC en los tejidos depende de la exposición a la luz y las condiciones climáticas (Cadot y Miñana Castelló, 2006). La tierra, también afecta la calidad de los TC, como cuando las uvas cultivadas en suelos arenosos con poca reserva de agua mostraron una proporción de prodelfinidinas más bajas que las uvas cultivadas en un suelo más rico (Cadot y Miñana

Castelló, 2006). El estrés generado por la agresión de las plantas por los herbívoros o patógenos induce un aumento de los metabolitos secundarios y un importante almacenamiento de taninos, especialmente los TC que se encuentran, en la zona atacada (Woodward y Coppock, 1995; Feucht et al., 1997).

2.5.5 Efectos de los taninos sobre la fisiología y producción de los pequeños rumiantes

Diferentes plantas taniníferas de los géneros *Acacia*, *Dochrostachys*, *Hedysarum*, *Leucaena*, *Lotus*, *Onobrychis*, *Populus*, *Rumex*, *Salix* (Mueller-Harvey, 2006), *Lysiloma* (Brunet et al., 2008a) *Piscidia* (Alonso-Díaz et al., 2008bc, 2009) y *Havardia* (Alonso-Díaz et al., 2010) han mostrado que pueden producir beneficios en rumiantes como nutraceuticos. Sin embargo, también pueden ocasionar efectos nocivos en los mismos (Ramírez-Restrepo y Barry, 2005; Mueller-Harvey, 2006).

Es importante no olvidar que tanto los beneficios y los efectos negativos que puedan provocar los TC dependen de muchos factores, sobre todo de la concentración y la estructura de los taninos (Hoste et al., 2006). También hay que recordar que existen otros factores, como la especie animal, el estado fisiológico del animal y la composición de la dieta (Makkar, et al., 2007), que van a determinar la acción de los taninos condensados en los animales. Ante esto, el nivel de consumo de los TC se clasifican en tres categorías en función de los efectos fisiológicos sobre los animales: 1) efecto bajo o nulo, 2) efecto benéfico y 3) efecto adverso (Aerts et al., 1999; Barry y McNabb, 1999; Paolini, 2004) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efectos de los taninos condensados (TC) sobre la nutrición y los valores zootécnicos en ovejas de acuerdo a su contenido en la dieta (Barry y McNabb, 1999; Reed, 1995; Waghorn et al., 1994ab).

Contenido de TC (MS)	Categoría	Efectos observados
< 2%	Bajo o Nulo	Ningún efecto sobre la ingestión voluntaria Prevención de timpanismo
3-6%	Benéfico	Aumento de la absorción de los aminoácidos Aumento de la tasa de ovulación Aumento de la producción de lana Aumento de la tasa de crecimiento
> 7%	Adverso	Bajo nivel de ingestión Reducción de la absorción de aminoácidos Reducción en la producción de la Reducción en la tasa de crecimiento

Efectos Tóxicos

En el pasado, los taninos eran referidos como factores anti-nutricionales que impactaban negativamente sobre la producción animal. Se sabe que los taninos son normalmente referidos a problemas de intoxicación cuando son consumidos por los animales domésticos. Los efectos dañinos o tóxicos que pudieran presentarse, se deben principalmente al tipo de tanino. Los TH son más tóxicos que los TC por su rápida absorción. Se debe a que no se enlazan con las proteínas y se absorbe ya sea de manera pura o a una mayor concentración. Estas intoxicaciones son referidas más a bovinos, sin embargo los pequeños rumiantes parecen ser más resistentes. Los TH dan origen a necrosis severas y ulceraciones del epitelio del esófago, estomacal, intestinal y de los tejidos hepáticos y renales (McLeod, 1974; McSweeney et al., 2001; Garg et al., 1992; Reed, 1995) esto puede provocar lesiones hepáticas y renales irreversibles, pudiendo causar la muerte entre los 5 y los 10 días post ingestión (Waghorn y McNabb, 2003).

Debido a la ausencia de absorción digestiva y el paso al torrente sanguíneo, la toxicidad asociada a los taninos condensados es mucho más moderada. La siguiente revisión está basada en los efectos que existen de los taninos condensados sobre los pequeños rumiantes como objetivo de esta tesis.

Efectos Fisiológicos

☉Consumo Voluntario.

Como anteriormente se mencionó la masticación logra romper las paredes celulares, liberando de las vacuolas los TC a la boca del animal. Esta liberación de los TC puede, en algunos casos, desencadenar un efecto sobre el consumo voluntario (CV) del alimento y puede modificar las funciones ruminales y post-ruminales. Sin embargo, para las leguminosas de clima templado el contenido de TC es de bajo a moderado (<4.5% de la MS) por lo que el consumo del alimento no se ve alterado (Waghorn et al., 1987; Terrill et al., 1992a). En cuanto a las plantas tropicales, estudios recientes han mostrado que la distribución del forraje, con contenidos de TC inferiores al 3% de la MS, no afectan el CV de la ración de los caprinos (Alonso-Díaz et al., 2008a), los ovinos (Alonso-Díaz et al., 2009) y los bovinos (Sandoval-Castro et al., 2005). Es importante mencionar que los animales comiendo PRT con PEG

(mezclado en el follaje ó ingerido antes y después del follaje) no aumentaron el consumo de forraje rico en taninos.

El efecto negativo, por otro lado, se ve reflejado en la reducción del CV cuando se consumen leguminosas forrajeras con un contenido elevado de TC (>10% TC de la MS) (Barry y McNabb, 1999), esto se puede traducir como una aversión del animal al alimento (Butter et al., 1999; Villalba y Provenza, 2007; Rochfort et al., 2008). Del mismo modo, la incorporación de quebracho (*Schinopsis spp.*) (1.5g/día) a la ración de los rumiantes ha sido asociada a una reducción del consumo de alimento (Landau et al., 2000; Clauss et al., 2003). En los rumiantes esta reducción del CV puede deberse a diversas causas:

- ✓ Astringencia, que es la sensación de sequedad, rugosidad y aspereza de la cavidad bucal, resultante de los enlaces de los TC con las proteínas salivares, en particular con las proteínas ricas en prolina (Butter et al., 1999; Gilboa et al., 2000; Bennick, 2002; Clauss et al., 2005; Haslam, 2007; Rochfort et al., 2008).

- ✓ Malestar post-ingestión, la ingestión de los TC perturba igualmente el sistema hormonal que controla el CV (Zimmer y Cordesse, 1996; Villalba y Provenza, 2007). La estimulación del sistema emético que resulta de la aversión por cierto alimento, induce malestar y consecuentemente el animal reduce su consumo (Villalba y Provenza, 2007).

◎Digestión de los alimentos.

Los TC intervienen en diferentes partes de la digestión. De hecho los parámetros zootécnicos o de producción son resultado de los efectos sobre la transformación sucesiva de los alimentos a nivel ruminal y post-ruminal. El rumen esta caracterizado por tener un pH de 6 a 7, a estos valores los complejos formados por los TC y las proteínas son estables (Aerts et al., 1999). Butter et al. (1999), proponen un esquema de la formación de complejos y la disociación de los TC y las proteínas en los rumiantes según el pH del órgano del TGI en el que estén (Figura 9). El efecto positivo de los TC a nivel del rumen está unido a la protección de las proteínas con respecto a la degradación ruminal. La formación de los complejos de los TC con las proteínas alimentarias dónde ó su fijación a las enzimas bacterianas reducen globalmente la proteólisis ruminal (Zimmer y Cordesse, 1996; Jean-Blain, 1998; Aerts et al., 1999; Min et al., 2003). Estos fenómenos han sido descritos en rumiantes consumiendo leguminosas forrajeras (Theodorou et al., 1999; Méndez-Ortíz, 2009). Una de las posibles

consecuencias es la reducción de la producción de metano y de amoníaco (McNabb et al., 1993; Theodorou et al., 1999; Hess et al., 2006ab; Animut et al., 2007). La protección de las proteínas alimentarias en el rumen induce un aumento del flujo de proteínas de sobrepaso a nivel del intestino por consecuencia, una absorción elevada de aminoácidos (McNabb et al., 1993; Barry y McNabb, 1999; Theodorou et al., 1999; Makkar, 2003; Min et al., 2003; Iqbal et al., 2007; Waghorn, 2008). El pH ácido del abomaso induce una disociación del complejo

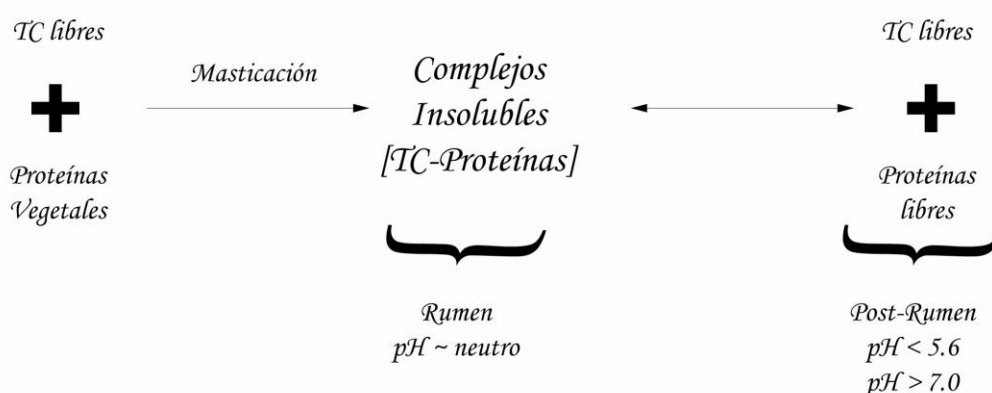


Figura 9. Esquema que representa la formación de los complejos tanino-proteína y su disociación según Butter et al. (1999).

TC-proteína y por consiguiente la liberación de las proteínas y de los aminoácidos permitiendo así su digestión y su absorción a nivel intestinal (Zimmer y Cordesse, 1996; Butter et al., 1999; McSweeney et al., 2001; McSweeney et al., 2008; Waghorn, 2008).

Los efectos negativos de los TC sobre la digestión de los pequeños rumiantes, inicia cuando hay signos de pérdidas en la producción ligados a la ingestión de fuertes cantidades de TC que provocan perturbaciones en el proceso de digestión. Los TC consumidos en grandes cantidades afectan la estructura de las mucosas digestivas. Por ejemplo, en ovinos que consumieron fuertes dosis de quebracho (16% de la ración) presentaron descamación y signos de degeneración y ulceraciones en el TGI (Hervás et al., 2003). En caprinos, al aumentar la dosis de TC en la ración, una pérdida de las células epiteliales del sistema digestivo con erosión de las micro vellosidades fue reportada (Mbhatta et al., 2002). A nivel del rumen, los enlaces tanino-proteína son menos digeridos esto sucede en el abomaso (Butter et al., 1999;

Mueller-Harvey, 2006; McSweeney et al., 2008). El consumo de los TC afecta también la digestión de lípidos y la producción de ácidos grasos (Butter et al., 1999; Mueller-Harvey, 2006; McSweeney et al., 2008). Las ingestiones masivas de los TC pueden perturbar la digestibilidad por una reducción global de la actividad enzimática de la flora (McSweeney et al., 2001; Rochfort et al., 2008). En el intestino, los TC afectan la fisiología digestiva al interactuar con las proteínas de la membrana de las células disminuyendo así la absorción de ciertas moléculas, como los minerales. Además, la fijación específica con enzimas puede afectar las últimas etapas de la digestión (Zimmer y Cordesse, 1996; Butter et al., 1999; McSweeney et al., 2001; Hervás et al., 2003; Waghorn, 2008).

Efectos sobre la Producción

Los TC mejoran la utilización de la proteína dietética, provocando un incremento en las tasas de crecimiento, peso vivo y lana, producciones altas de leche, incremento en la fertilidad, y mejorando el bienestar y salud animal ya que los TC previenen el timpanismo y disminuyen las cargas parasitarias (Mueller-Harvey, 2006).

© Crecimiento y ganancia de peso.

El consumo de PRT en cantidad moderada influye sobre el crecimiento de animales jóvenes (Leathwick y Athkinson, 1996; Waghorn y McNabb, 2003; Ramírez-Restrepo y Barry, 2005; Rochfort et al., 2008). Así como un promedio de 8% de ganancia de peso vivo ha sido observada en corderos que recibieron *L. corniculatus* (2-4% TC de la MS) (Aerts et al., 1999). Así mismo, los bovinos que consumieron *Salix sp.* (2.7% TC de la MS) tuvieron una mejor ganancia de peso aún cuando pastorearon en una parcela pobre durante el verano con respecto a aquellos animales que no consumieron TC (Moore et al., 2003).

© Producción de Leche.

En los rumiantes la ingestión de TC influye en el nivel de producción y la calidad de leche (Aerts et al., 1999; Min et al., 2003; Molle et al., 2003; Waghorn y McNabb, 2003; Rochfort et al., 2008). Dentro de un período de consumo de *L. corniculatus*, la producción de leche aumentó un 60% en bovinos y un 21% en ovinos (Min et al., 2003). Los TC contribuyen en la composición de la leche, ya que ha sido observada una elevación del 10% de la tasa proteica (contenido de proteína en la leche) en vacas y un 12% en borregas que ingirieron TC,

así como también los niveles de lactosa (14% en las borregas), con respecto a los animales testigo (Aerts et al., 1999; Min et al., 2003; Rochfort et al., 2008).

☉ **Producción de lana.**

Un aporte moderado de TC del 2 al 4% en la ración, ha sido asociado a un aumento en la producción de lana. El crecimiento de la lana es muy sensible a la absorción de proteína, por ejemplo, el consumo de *L. corniculatus* (Luque et al., 2000) y *O. viciifolia* (Rochfort et al., 2008) por ovejas que las han consumido reportan incrementos en la absorción de aminoácidos y retención de N y particularmente la cisteína que es indispensable para la síntesis de la lana (McNabb et al., 1993).

☉ **Parámetros Reproductivos**

Muy pocos estudios han considerado el efecto potencial del consumo de TC sobre la reproducción. Sin embargo, lo pocos que hay, han demostrado que el consumo de leguminosas forrajeras ricas en TC induce mejores parámetros reproductivos en la ovejas, medidos por un aumento en la tasa de ovulación (Min et al., 2003; Ramírez-Restrepo y Barry, 2005; Rochfort et al., 2008).

Un consumo elevado de TC va a propiciar efectos detrimentales para los parámetros zootécnicos de la producción. Los contenidos elevados de TC afectaron negativamente la producción de leche en bovinos que consumieron *Acacia boliviana*, *Calliandra calothyrsus* y *Leucaena leucocephala* dos plantas tropicales con elevados contenidos de TC (Maasdorpa et al., 1999). Una ingestión importante de TC (>9% de MS) ha sido asociada a un efecto negativo en la producción de lana (Luque et al., 2000; Min et al., 2003; Ramírez-Restrepo y Barry, 2005).

Efectos sobre la Salud

☉ **Prevención del Timpanismo.**

El consumo de TC ha sido asociado a la prevención del timpanismo (Ramírez-Restrepo y Barry, 2005; Rochfort et al., 2008; Waghorn, 2008). En los rumiantes, este fenómeno resulta en una acumulación de gas excesiva debido a la fermentación ruminal de proteínas solubles en la ración (Aerts et al., 1999; Waghorn y McNabb, 2003; Rochfort et al., 2008). Alimentos ricos en proteínas provocan el timpanismo y por el contrario alimentos que

contienen TC (0.5% de MS) evitan el timpanismo de las dietas ricas en proteína (Aerts et al., 1999; Butter et al., 1999; Min et al., 2003; Rochfort et al., 2008). Los complejos tanino-proteína alimentaria limita las fermentaciones en el rumen y disminuyen el timpanismo (Zimmer y Cordesse, 1996; Waghorn y McNabb, 2003). Además los TC inhiben el crecimiento y la multiplicación de microorganismos del rumen por su fijación a los constituyentes de las paredes celulares, bloqueando así el transporte molecular vital para el microorganismo (Pell et al., 1999; McSweeney et al., 2008).

● Efecto antihelmíntico

El efecto antihelmíntico de los TC ha sido ampliamente investigado en pequeños rumiantes (Hoste et al., 2006; Athanasiadou, et al., 2007; Alonso-Díaz et al., 2010). Este efecto será descrito en el punto 2.5.7.

2.5.6 Consumo de las PRT por los pequeños rumiantes

Las PRT representan a cierto grupo de plantas que tienen bajo contenido de proteína y/o energía en combinación con la presencia de metabolitos secundarios como los taninos pudiendo causar daño a los animales (Waghorn, 2008). El hecho de que las PRT sean consumidas por los rumiantes, es el resultado de una adaptación, que se traduce en estrategias de comportamiento y de carácter fisiológico para contrarrestar los efectos negativos (Duncan y Gordon; 1999; Jog y Watve, 2005; Provenza, 2006; Lisonbee et al., 2009). Alonso-Díaz et al. (2010), establece que caprinos y ovinos con experiencia de pastoreo en el trópico muestran adaptaciones para consumir las plantas de su entorno. Consumiendo primero aquellas que son más digestibles (con menos cantidad de lignina y fibra no digestible). Aparentemente hacen una selección del material digestible y el siguiente criterio de selección es la composición de taninos de aquellas plantas. Además, como se ha dicho antes, no hay un incremento en el consumo de PRT cuando se añade PEG (bloqueador de la acción tánica) a la dieta. Este mismo estudio establece que las cabras son capaces de consumir más PRT que los borregos. Esto es evidencia de una adaptación de los animales ya que pueden consumir dichas plantas aparentemente regulando los efectos negativos que los taninos pudieran causarles y segundo una adaptación o mayor tolerancia por la especie de rumiante a las PRT.

2.5.7 Efectos Antihelmínticos de los Taninos Condensados

Las plantas que contienen componentes antihelmínticos son alternativas de control integral de NGI en una producción sustentable. Diversos estudios confirman que muchas plantas han sido utilizadas para el control de los NGI (Hoste et al., 2006; Makkar et al., 2007; Athanasiadou et al., 2009; Alonso-Díaz et al., 2010), utilizando desde hojas, extractos, tallos, frutos, semillas, etc. en diferentes latitudes del mundo y con diferentes técnicas, dando resultados positivos a dicho control (Makkar et al., 2007). El efecto de los TC sobre el control de NGI se ha evaluado *in vitro* e *in vivo*. Las fuentes de TC utilizadas han sido leguminosas de clima templado, por ejemplo, sulla (*H. coronarium*) y sainfoin (*O. viciifolia*) y de extractos obtenidos del árbol de quebracho (*Schinopsis* sp.) (Hoste et al., 2006), así como extractos de leguminosas de clima tropical como *Acacia* y *Leucaena* (Makkar et al., 2007; Alonso-Díaz et al., 2010), *Lysiloma* (Brunet et al., 2008a; Alonso-Díaz et al., 2010) y *Havardia albicans*. Grupos científicos como los de Hoste et al. (2006) y Ketzis et al. (2006), establecen que el efecto antihelmíntico de los TC está determinado por dos panoramas: un efecto *directo* y un efecto *indirecto*.

a) Efecto Indirecto de los Taninos Condensados sobre los NGI

El efecto indirecto, es cuando los taninos pueden actuar indirectamente, al mejorar la respuesta del hospedero ante el parásito o mejor dicho la resistencia del hospedero.

La **resistencia del hospedero** se define como la habilidad del hospedero de afectar la biología del nemátodo y disminuir el establecimiento de la L₃, por retrasar el crecimiento del parásito, reduciendo la fertilidad de la hembra y la excreción de huevos o por expulsar la población de parásitos adultos existentes (Torres-Acosta y Hoste, 2008). Esta resistencia está gobernada por mecanismos inmunes. No se puede hablar de resistencia si no se habla también de **resiliencia**, la cual es definida como un segundo componente de la respuesta del hospedero al parasitismo. La resiliencia es la habilidad del hospedero de resistir a los efectos patológicos de los parásitos en el TGI (Torres-Acosta y Hoste, 2008).

Entonces el efecto indirecto principalmente participa en aumentar y mejorar la resistencia y/o resiliencia del rumiante contra los NGI. Es importante mencionar que a pesar

de que parezca ilógico si se aumenta la resiliencia no siempre va a aumentar la resistencia (Torres-Acosta et al., 2004; Torres-Acosta y Hoste, 2008).

Athanasiadou et al. (2009), sugieren que las plantas ricas en metabolitos secundarios juegan un papel importante en la resiliencia del hospedero parasitado, aumentando la capacidad para enfrentar una infección sin castigar o comprometer su rendimiento, sin embargo este mecanismo es aún desconocido.

Los TC pueden actuar de esta forma indirectamente, cuando éstos se enlazan con la proteína formando los complejos ya mencionados (Figura 9), permitiendo que la proteína dietética no sea digerida a nivel ruminal y pase al TGI y sea degradada y absorbida como aminoácidos (Min et al., 2003; Hoste et al., 2006). Los rumiantes que se les ha proporcionado dieta con taninos van a excretar menos N urinario y únicamente un poco de N fecal, esto como resultado de una mayor absorción de aminoácidos de la dieta (Muller-Harvey, 2006). Esta condición hace que el hospedero mejore su homeostasis y su respuesta inmunitaria en contra de los parásitos, y el mejoramiento de la utilización de los nutrientes por parte del hospedero al tener en la dieta TC contribuye a su vez a un mejoramiento en la resiliencia normal observada en los animales infectados.

La hipótesis es que mejorando los niveles de aminoácidos disponibles en el organismo del hospedero, se da lugar a una respuesta celular (inflamatoria) inmediata en el TGI ante una parasitosis. Paolini et al. (2003b), evaluaron dicha respuesta celular ante cabras infectadas por *H. contortus* que consumieron quebracho, teniendo como resultado un aumento en el número de células inflamatorias de la mucosa fúndica con respecto al grupo control. En otro estudio (Brunet et al., 2008a) evaluaron la mucosa de cabritos infectados por NGI que consumieron *Lysiloma latisiliquum* presentando un ligero aumento de células inflamatorias con respecto al grupo control, probablemente el tiempo de exposición al que estuvieron con los TC no fue suficiente (10 días) y un reciente estudio en ovejas infectadas con *T. colubriformis* que consumieron *O. viciifolia* presentan un ligero aumento de las células inflamatorias (Ríos-De-Álvarez et al., 2008). Los resultados de los tres experimentos no son contundentes y dejan clara la necesidad de seguir investigando este mecanismo de respuesta inflamatoria en la mucosa del TGI. Desafortunadamente, este tipo de experimentos, necesitarían más tiempo

para poder llegar a medir realmente una respuesta indirecta al aumentar la resiliencia y la resistencia del hospedero ante los nemátodos gastrointestinales.

En conclusión, tanto los efectos directos como los efectos indirectos son aún, desconocidos y existen dos grandes interrogantes en la manera en la que afectan los taninos condensados a los parásitos. En la Figura 10 se puede observar cómo se plantean las dos hipótesis de estos efectos. Existen aún muchas dudas en el proceso del tránsito de los TC por el organismo y es otro gran tema a profundizar. Se ha comprobado el efecto que tiene una buena nutrición sobre las parasitosis en pequeños rumiantes, elevando así la respuesta inflamatoria del TGI (Hoste et al., 2008), sin embargo en lo que respecta a las PRT aún queda mucho por investigar.

También es importante considerar que tanto para un efecto directo o indirecto la acción antihelmíntica de los taninos puede estar influenciada por diversos factores (Athanasidou et al., 2007). Por ejemplo, cuando a los rumiantes se les proporciona dietas altas en proteína, los taninos pueden permanecer en los complejos con la proteína pasando por todo el tracto, esto, probablemente sucede porque la proteína dietética ingerida no fue absorbida y fue enteramente excretada ya que estaba enlazada en los taninos y por lo tanto esto puede disminuir su actividad antihelmíntica (Athanasidou et al., 2001b). Las propiedades antihelmínticas de las PRT y su potencial, requiere de un análisis más profundo como lo establece Athanasidou et al. (2007), el cual permite evaluar cada uno de los elementos micro y macro ambientales de la producción de rumiantes en cuestión.

b) Efecto Directo de los Taninos Condensados sobre los NGI

El efecto directo, ha sido definido como la posibilidad de que los taninos puedan tener una propiedad antihelmíntica sobre el parásito mismo, afectando severamente los procesos biológicos del nemátodo (Hoste et al., 2006). Así por ejemplo, se ha reportado que los taninos tienen un efecto directo sobre los diferentes estadios de los NGI tanto *in vitro* como *in vivo* (Athanasidou et al., 2001a; Ketzis et al., 2006). Definiendo ese efecto sobre todo en los estudios *in vitro* como un efecto dinámico, relacionado a la dosis y con una eficacia cercana al 100% (Ketzis et al., 2006). Los extractos de diversas plantas han inhibido la migración larvaria (Molan et al., 2000abc; Athanasidou et al., 2001a; Molan et al., 2003ab), han

disminuido la excreción de huevos en heces y han disminuido la fertilidad de las hembras adultas (Paolini et al., 2003b).

Estos eventos se pueden constatar en ambas especies de nemátodos importantes para el medio tropical como lo son *H. contortus* y *T. colubriformis*. Por ejemplo, Paolini et al. (2003a), reportan que existe un efecto significativo de los taninos condensados provenientes del sainfoin (*O. viciifolia*) y de tres diferentes plantas (*Rubus fruticosus*, *Quercus robur*, *Corylus avellana*), inhibiendo la migración de las larvas L₃. En un estudio más reciente (Ademola et al., 2005), se determinó que los polifenoles provenientes de una planta tropical (*Leucaena leucocephala*) tienen un efecto directo sobre *H. contortus* evitando el desarrollo de la larva L₁ a L₃. Maciel et al. (2006), confirman la actividad larvicida y ovicida de otra planta tropical rica en taninos condensados (*Melia azedarach*) sobre el mismo parásito. Por otra parte, un estudio del mecanismo de acción de los taninos condensados sobre el desenvaine de las L₃ de *H. contortus* y *T. colubriformis* ha mostrado retraso ó inhibición total de la pérdida de la vaina en función de la planta aplicada (Bahuaud et al., 2006, Brunet et al., 2007; 2008b). Brunet y Hoste (2006), confirmaron este efecto, pero determinan que monómeros (flavan-3-ols) de los taninos condensados afectan ésta no pérdida de la cutícula y establecen que hay diferencias de susceptibilidad a los taninos por la especie parasitaria (*H. contortus* y *T. colubriformis*), y que puede deberse a las características y composición de la superficie externa de cada parásito, indicando un posible efecto de la interacción de la proteína parasitaria y el tanino condensado. Así mismo, Brunet et al. (2007), determinan *in vitro* la acción directa de los taninos al momento de inhibir el desenvaine y confirma al mismo tiempo que *in vivo* en infecciones tempranas los taninos condensados del sainfoin tienen un efecto antihelmíntico al inhibir el desenvaine larvario. La acción antihelmíntica de diferentes plantas tropicales principalmente *L. latisiliquum* con efectos directos importantes sobre *H. contortus* y *T. colubriformis* en el establecimiento larvario (Brunet et al., 2008a), en la inhibición del desenvaine y la inhibición de la migración larvaria (Alonso-Díaz et al., 2008bc).

La investigación sobre el efecto directo de los taninos en los parásitos adultos de estas dos especies de nemátodos, es muy escasa y aún insuficiente. Solo se ha podido medir cierta acción sobre una reducción de la excreción de huevos, una disminución de la carga parasitaria y de la fertilidad de la hembra, así como ciertos estudios preliminares sobre la viabilidad del parásito adulto (Paolini et al., 2003b; Waghorn et al., 2006; Cenci et al., 2007; Iqbal et al., 2007). Es por esto que la tesis se centrará en el efecto directo de las PRT específicamente sobre la población adulta de los NGI. Sin embargo, de manera general, todavía se desconocen mecanismos básicos de su funcionamiento como la forma directa en que afectan a los parásitos en los diferentes estadios de su vida (Figura 10), por ejemplo, si los TC son consumidos, absorbidos, digeridos por el nemátodo o el simple contacto del TC con el parásito, es el que hace que éstos se vean directamente afectados y posteriormente mueran. No se sabe de qué manera o en qué grado los taninos condensados dañan de manera funcional, estructural y química a los parásitos de los pequeños rumiantes. De las dos hipótesis que existen sobre si los TC tienen un efecto directo o indirecto (ver Figura 3), los avances que se han obtenido hasta

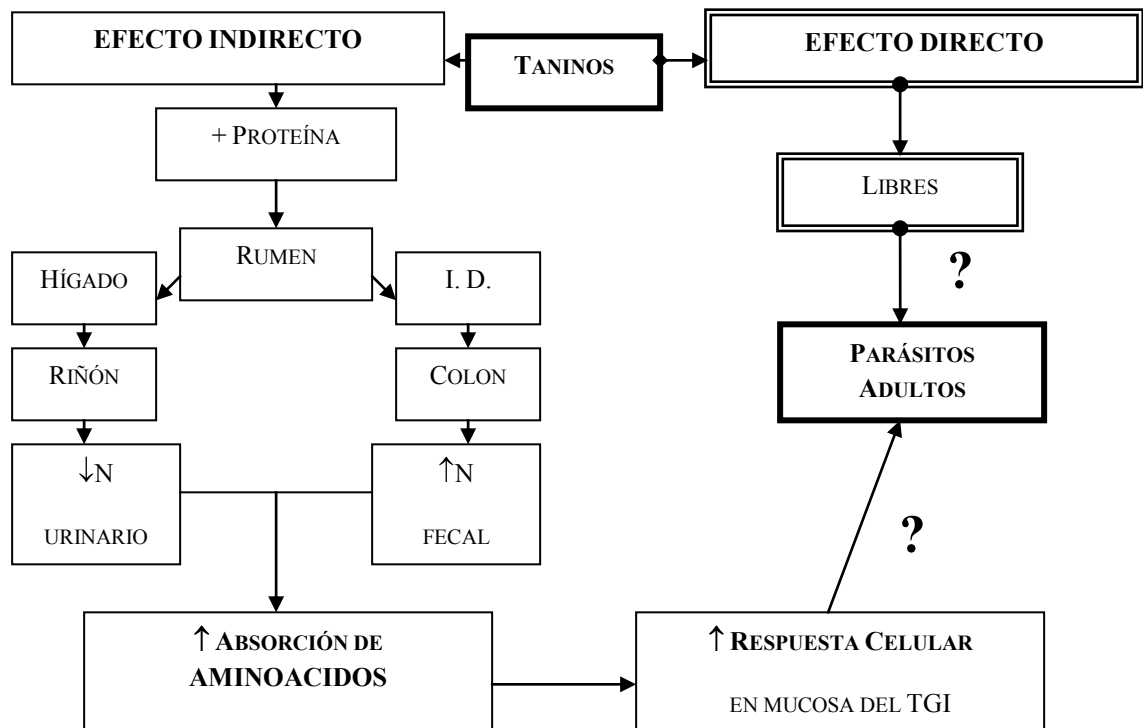


Figura 10. Esquema del efecto directo e indirecto de los taninos sobre los parásitos (modificado de Muller-Harvey, 2006).

ahora se inclinan sobre una propiedad antihelmíntica directa. Esto es, sabiendo que los TC tienen una afinidad para formar complejos, este mecanismo indirecto se convierte en directo cuando los taninos condensados afectan la integridad de la cutícula de los parásitos, uniéndose a la prolina (proteína que recubre dicha cutícula) (Kahn y Díaz-Hernandez, 2000; Hoste et al., 2006; Muller-Harvey, 2006). Athanasiadou et al. (2009), establece que el efecto antihelmíntico de las plantas ricas en metabolitos secundarios está atribuido a diferentes mecanismos: 1) Inhibición de la motilidad, 2) Inhibición de la alimentación, 3) Inhibición del desarrollo y 4) Inhibición de la supervivencia; con los cuales se puede resumir el efecto directo antihelmíntico de las PRT. La siguiente tesis se enfocó principalmente a participar en los mecanismos directo e indirecto de los PRT sobre los NGI de los pequeños rumiantes, utilizando a *H. contortus* y *T. colubriformis* como parásitos modelo.

3. HIPOTESIS

La utilización de follaje de las plantas ricas en taninos (PRT), tendrá un efecto directo funcional, estructural y ultra-estructural sobre la población adulta de *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis* presentes en los pequeños rumiantes.

La utilización de follaje de las PRT, tendrá un efecto indirecto sobre la población adulta de *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis* provocando una respuesta de tipo celular en la mucosa abomasal e intestinal de los pequeños rumiantes.

4. OBJETIVOS

- 1) Determinar el efecto **directo** *in vitro* de diferentes extractos de plantas ricas en taninos condensados, sobre la biología, la estructura externa y la ultraestructura de los parásitos adultos *Haemonchus contortus*.
- 2) Determinar el efecto **directo** *in vivo* del consumo de follaje de plantas ricas en taninos condensados sobre la biología, la estructura externa y la ultraestructura de los parásitos adultos *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis* en pequeños rumiantes.
- 3) Determinar el efecto **indirecto** *in vivo* del consumo de plantas ricas en taninos sobre los parásitos adultos *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis* en pequeños rumiantes.

5. REFERENCIAS

- Ademola, I.O.; Akanbi, A.I.; Idowu, S.O. (2005). Comparative nematocidal activity of chromatographic fractions of *Leucaena leucocephala* seed against gastrointestinal sheep nematodes. *Pharmaceutical Biology*. 45:599-604.
- Aerts, R.J.; Barry, T.N.; Mc Nabb, W.C. (1999). Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 75:1-12.
- Aguilar Caballero, A.J.; Torres Acosta, J.F.; Hoste, H.; Sandoval Castro, C.; López Flores, M. (2005). Effect of supplementary feeding with energy and/or protein on the resilience and resistance of criollo kids against *Haemonchus contortus*. Congress of Novel Approaches to the control of helminth parasites of livestock. Worm Control or worm management: new paradigms in integrated control. Mérida, Yucatán, México. p. 29.
- Akkari, H.; Ben Salem, H.; Gharbi, M.; Abidi, S.; Darghouth, M.A. (2007). Feeding *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage to Barbarine lambs with or without PEG: Effect on the excretion of gastro-intestinal nematode eggs. *Animal Feed Science and Technology*. 147:182-192.
- Alonso-Díaz, M.A.; Torres-Acosta, J.F.J.; Sandoval-Castro, C.A.; Hoste, H.; Aguilar-Caballero, A.; Capetillo-Leal, C.M. (2008a). Is goats' preference of forage trees affected by their tannin or fiber content when offered in cafeteria experiments? *Animal Feed Science and Technology*. 141:36-48.
- Alonso-Díaz, M.A.; Torres-Acosta, J.F.J.; Sandoval-Castro, C.A.; Capetillo-Leal, C.; Brunet, S.; Hoste, H. (2008b). Effects of four tropical tanniniferous plant extracts on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. *Veterinary Parasitology*. 153:187-92.
- Alonso-Díaz, M.A.; Torres-Acosta, J.F.J.; Sandoval-Castro, C.A.; Aguilar-Caballero, A.J.; Hoste, H. (2008c). *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. *Veterinary Parasitology*. 153:31331-9.
- Alonso-Díaz, M.A.; Torres-Acosta, J.F.J.; Sandoval-Castro, C.A.; Hoste, H.; Aguilar-Caballero, A.J.; Capetillo-Leal, C.M. (2009). Preference of tanniniferous tree fodder offered to sheep and its relationship with *in vitro* gas production and digestibility. *Animal Feed Science and Technology*. 151:75-85.
- Alonso-Díaz, M.A.; Torres-Acosta, J.F.J.; Sandoval-Castro, C.A.; Hoste, H. (2010). Tannins in tropical tree fodders to small ruminants: A friendly foe? *Small Ruminant Research*. 89:164-173.
- Animut, G.; Puchala, R.; Goetsch, A.L.; Patra, A.K.; Sahlu, T.; Varel, V.H.; Wells, J. (2007). Methane emission by goats consuming different sources of condensed tannins. *Animal Feed Science and Technology* 144:228-241.
- Aoki, T.; Akashi, T.; Ayabe, S. (2000). Flavonoids of leguminous plants: structure, biological activity and biosynthesis. *Journal of Plant Research*. 113:475-488.
- Athanasiadou, S.; Kyriazakis, I.; Jackson, F.; Coop, R.L. (2001a). Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep/in vitro and in vivo studies. *Veterinary Parasitology*. 99:205-219.
- Athanasiadou, S.; Kyriazakis, I.; Jackson, F.; Coop, R.L. (2001b). The effects of condensed tannins supplementation of foods with different protein content on parasitism, food intake and performance of sheep infected with *Trichostrongylus colubriformis*. *British Journal of Nutrition*. 86:697-706.
- Athanasiadou, S.; Githiori, J.; Kyriazakis, I. (2007). Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction. *Animal*. 1:1392-1400.

- Athanasiadou, S.; Kyriazakis, I.; Giannenas, I.; Papachristou, T.G. (2009). Nutritional consequences on the outcome of parasitic challenge on small ruminants. En: Nutritional and foraging ecology of sheep and goats. Options Méditerranéennes. 85:29-40.
- Ayres, M.P.; Clausen, T.P.; MacLean, S.F.; Redman, A.; Reichardt, P.B. (1997). Diversity of structure and antiherbivore activity in condensed tannins. Ecology. 78:1696-1712.
- Baba-Moussa, F.; Akpagana, K.; Bouchet, P. (1999). Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. Journal of Ethnopharmacology. 66:335-338.
- Bahuaud, D.; Martínez-Ortiz de Montellano C.; Chauveau, S.; Prevot, F.; Torres-Acosta, F.; Fouraste, I. (2006). Effect of four tanniferous plant extract on the *in vitro* exsheathment of third stage larvae of parasite nematodes. Parasitology. 132:545-554.
- Bang K.S.; Familton, A.S.; Sykes, A.R. (1990). Effect of copper oxide wire particle treatment on establishment of major gastrointestinal nematodes in lambs. Research in Veterinary Science. 49:132-137.
- Barger, I.A.; Siale, K.; Banks, D.J.D.; LeJambre, L.F. (1994). Rotational grazing for control of gastrointestinal nematodes of goats in a wet tropical environment. Veterinary Parasitology. 53:109-116.
- Barger, I.A. (1999). The role of epidemiological knowledge and grazing management for helminth control in small ruminants. International Journal of Parasitology. 29:41-47.
- Barrau, E.; Fabre, N.; Fouraste, I.; Hoste, H. (2005). Effect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia Scop.*) on the *in vitro* larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. Parasitology. 131:531-538.
- Barry, T.N.; Mc Nabb, W.C. (1999). The effect of condensed tannins in temperate forages on animal nutrition and productivity. En: *Tannins in livestock and human nutrition: ACIAR Proceedings* (BROOKER, ed.). Canberra, Australia Pp. 30-35.
- Behnke, J.M.; Menge, D.M.; Noyes, H. (2009). *Heligmosomoides bakeri*: a model for exploring the biology and genetics of resistance to chronic gastrointestinal nematode infections. Parasitology. 136:1565-1580.
- Bennick, A. (2002). Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine. 13:184-196.
- Borgers, M.; De Nollin, S. (1975). Ultrastructural changes in *Ascaris suum* intestine after mebendazole treatment *in vivo*. Journal of Parasitology. 61:110-122.
- Borgers, M.; De Nollin, S.; De Brabander, M.; Thienpont, D. (1975a). Influence of the anthelmintic mebendazole on microtubules and intracellular organelle movement in nematode intestinal cells. American Journal of Veterinary Research. 36:1153-1166.
- Borgers, M.; De Nollin, S.; Verheyen, A.; Vanparija, O.; Thienpont, D. (1975b). Morphological changes in cysticerci of *Taenia taeniaeformis* after mebendazole treatment. Journal of Parasitology. 61:830-843.
- Borreani, G.; Peiretti, P.G.; Tabacco, E. (2003). Evolution of yield and quality of sainfoin (*Onobrychis viciifolia scop.*) in the spring growth cycle. Agronomie. 23:193-201.
- Bowman, D.D. (2004). Parasitología para veterinarios de Georgis. Elsevier. Madrid, España. p 167.

- Brard, C.; Chartier, C. (1997), Quand suspecter une strongylose digestive chez les ovins et les caprins et conduite a tenir. *Le Point Vétérinaire*. 28 :83-88.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 56:317-333.
- Brunet, S.; Hoste, H. (2006). Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 54:7481-7487.
- Brunet, S.; Aufrere, J.; El Babili, F.; Fouraste, I.; Hoste, H. (2007). The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in the presence of a tannin-rich plant extract. *Parasitology*. 134:1253-1262.
- 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. (2008a). Effect of the consumption of *Lysiloma latisiliquum* on the larval establishment of gastrointestinal nematodes in goats. *Veterinary Parasitology*. 157:81-88.
- Brunet, S.; Jackson, F.; Hoste, H. (2008b). Effects on sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. *International Journal of Parasitology*. 38:783-790.
- Bruneton, J. (1999). Tanins. En: *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales*. 3th. Edition. Pp. 307-404.
- Butter, N.L.; Dawson, J.M.; Buttery, P.J. (1999). Effects of dietary tannins on ruminants. In: *Secondary Plant Products*. Nottingham-University-Press, Nottingham, Pp. 51-70.
- Cachat, E.; Newlands, G.F.J.; Ekoja, S.E.; Mcallister, H.; Smith, W.D. (2010). Attempts to immunize sheep against *Haemonchus contortus* using a cocktail of recombinant proteases derived from the protective antigen, Hgal-GP. *Parasite Immunology*. 32:414-419.
- Cadot, Y.; Miñana Castelló, M.T.C. (2006). Flavan-3-ol compositional changes in grape berries (*Vitis vinifera L. cv Cabernet Franc*) before veraison, using two complementary analytical approaches, HPLC reversed phase and histochemistry. *Analytica Chimica Acta*. 563: 65-75.
- Camarena-Gutiérrez, G. (2009). Señales en la interacción planta insecto. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 81:81-85.
- Canul-Ku, H.L.; Torres-Acosta, J.F.J.; Pérez-Cruz, M.; Aguilar-Caballero, A.J.; Cámara-Sarmiento, R.; Van-Wyk, J. (2008). Two years field evaluation of a selective anthelmintic treatment scheme for goats in tropical Mexico. In: *Proceedings of the 9th International Conference on Goats*. Querétaro, Qro., México. p 280.
- Casado-Vela, J. (2004), Aproximación cinética, molecular y proteómica al estudio de podredumbre apical en frutos de tomate *Lycopersicon esculentum*. Implicación de polifenol oxidasa (PPO) y enzimas antioxidantes. Tesis de Doctorado. Universidad de Alicante.
- Cenci, F.B.; Louvandini, H.; McManus, C.M.; DellPorto, A.; Costa, D.M.; Araujo, S.C.; Minho, A.P.; Abdalla, A.L. (2007). Effects of condensed tannin from *Acacia mearnsii* on sheep infected naturally with gastrointestinal helminthes. *Veterinary Parasitology*. 144:132-137.
- Collingborn, F.M.B.; Gowen, S.R.; Mueller-Harvey, I. (2000). Investigations into the biochemical basis for nematode resistance in roots of three *Musa* cultivars in response to *Radopholus similis* infection. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 48:5297-5301.

- Chandrawathani, P.; Jamnah, O.; Waller, P.J.; Larsen, M.; Gillespie, A.T.; Zahari, W.M. (2003). Biological control of nematode parasites of small ruminants in Malaysia using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*. *Veterinary Parasitology*. 117:173-183.
- Chartier, C.; Etter, E.; Hoste, H.; Pors, I.; Koch, C.; Dellac, B. (2000). Efficacy of copper oxide needles for the control of nematode parasites in dairy goats. *Veterinary Research Communications*. 24:389-399.
- Chartier, C.; Hoste, H. (2004). L'utilisation des anthelminthiques chez la chèvre : efficacité et durabilité. *Bulletin G.T.V. Hors-série*. Pp. 125-130.
- Chung, K.T.; Wei, C.I.; Johnson, M.G. (1998). Are tannins a double-edged sword in biology and health? *Trends in Food Science and Technology*. 9:168-175.
- Clauss, M.; Lason, K.; Gehrke, J.; Lechner-Doll, M.; Fickel, J.; Grune, T.; Streich, W.J. (2003). Captive roe deer (*Capreolus capreolus*) select for low amounts of tannic acid but not quebracho: fluctuation of preferences and potential benefits. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 136:369-382.
- Clauss, M.; Gehrke, J.; Hatt, J.M.; Drenfeld, E.S.; Flach, E.J.; Hermes, R.; Castell, J.; Streich, W.J.; Fickel, J. (2005). Tannin-binding salivary proteins in three captive rhinoceros species. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 140:67-72.
- Conegero-Sanchez, A.C.; Cristiny-Lopez, G.; Vataru-Nakamura, C.; Prado-Dias-Filho, B.; Palazzo de Mello, J.C. (2005). Antioxidant and antifungal activities of extract and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*. 41:102-107.
- Coop, R.L.; Holmes, P.H. (1996). Nutrition and parasite interaction. *International Journal of Parasitology*. 26:951-962.
- Coop, R.L.; Kyriazakis, I. (2001). Influence of host nutrition on the development and consequences of nematodes parasitism in ruminants. *Trends in Parasitology*. 17:325-330.
- Domínguez-Alpizar, J.L.; Rodríguez-Vivas, I.; Honhold, N. (1993). Epizootiología de los parastios gastrointestinales en bovinos del estado de Yucatán. *Veterinaria México*. 24:189-193.
- Duncan, A.J.; Gordon, I.L. (1999). Habitat selection according to the ability of animals to eat, digest and detoxify foods. *Proceedings of the Nutrition Society*. 58:799-805.
- Eck, G.; Fiala, B.; Linsenmair, K.E.; Bin-Hashim, R.; Proksch, P. (2001). Trade-off between chemical and biotic antiherbivore defense in the South East Asian plant genus *acaranga*. *Journal of Chemical Ecology*. 27:1979-1996.
- FAO, (2003). Resistencia a los antiparasitarios. Estado actual con énfasis en América Latina. Estudio FAO, Producción y Sanidad Animal. No. 157. Roma.
- Feucht, W.; Treutter, D.; Christ, E. (1997). Role of flavanols in yellowing beech trees of the Black forest. *Tree Physiology*. 17:335-340.
- Feucht, W.; Treutter, D. (1999). The role of flavan-3-ols and proanthocyanidins in plant defence. In: Principles and practices in chemical ecology, PRESS et BOCA RATON (Eds.), Pp. 307-338.
- Foo, L.Y.; Lu, Y.; Mc Nabb, W.C.; Waghorn, G.; Ulyatt, M.J. (1997). Proanthocyanidins from *Lotus pedunculatus*. *Phytochemistry*. 45:1689-1696.

- Frutos, P.; Raso, M.; Hervás, G.; Mantecon, A.R.; Pérez, V.; Giraldez, F.J. (2004). Is there any detrimental effect when a chestnut hydrolysable tannin extract is included in the diet of finishing lambs? *Animal Research*. 53:127-136.
- Fukuchi, K.; Sakagami, H.; Okuda, T.; Hatano, T.; Tanuma, S.; Kitajima, K.; Inoue, Y.; Inoue, S.; Ichikawa, S.; Meihan, N.; Honno, K. (1989). Inhibition of herpes simplex virus infection by tannins and related compounds. *Antiviral Research*. 11:285-297.
- Garg, S.K.; Makkar, H.P.S.; Nagal, K.B.; Sharma, S.K.; Wadhwa, D.R.; Singh, B. (1992). Toxicological investigations into oak (*Quercus incana*) leaf poisoning in cattle. *Veterinary and Human Toxicology*. 34:161-164.
- Gilboa, N.; Perevolotsky, A.; Landau, S.; Nitsan, Z.; Silanikove, N. (2000). Increasing productivity in goats grazing Mediterranean woodland and scrubland by supplementation of polyethylene glycol. *Small Ruminant Research*. 38:183-190.
- Githiori, J. B.; Athanasiadou, S.; Thamsborg, S. M. (2006). Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Veterinary Parasitology*. 139:308-320.
- González-Garduño, R.; Torres-Hernández, G.; Nuncio-Ochoa, M.G.J.; Cuéllar-Ordaz, J. A.; Zermeño-García, M.E. (2003). Detección de eficiencia antihelmíntica en nemátodos de ovinos de pelo con la prueba de reducción de huevos en heces. *Livestock Research Rural Development*. <http://www.lrrd.org/lrrd15/12/gonza1512.htm>
- Granados-Sánchez, D.; Ruíz-Puga, P.; Barrera-Escorcia, H. (2008). Ecología de la Herbivoría. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 14:51-63.
- Hagerman, A.E. (1992). Tannin protein interactions. In: Phenolic compounds in food and their effects on health: Analysis, occurrence and chemistry, HO, LEE et HUANG (Eds.), American chemical society, Washington DC, Pp. 236-247.
- Hagerman, A.E. (2002). Tannin Chemistry. Disponible en URL : <http://www.users.muohio.edu/hagerman>
- Haslam, E. (2007). Vegetable tannins - Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry*. 68:2713-2721.
- Hatano, T.; Kusuda, M.; Inada, K.; Ogawa, T.O.; Shiota, S.; Tsuchiya, T.; Yoshida, T. (2005). Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*. 66:2047-2055.
- Heil, M.; Baumann, B.; Andary, C.; Linsenmair, K.E.; McKey, D. (2002). Extraction and quantification of condensed tannins as a measure of plant anti-herbivore defense? Revisiting an old problem. *Naturwissenschaften*. 89:519-524.
- Hedqvist, H.; Mueller-Harvey, I.; Reed, J.D.; Krueger, C.G.; Murphy, M. (2000). Characterization of tannins and *in vitro* protein digestibility of several *Lotus corniculatus* varieties. *Animal Feed Science and Technology*. 87:41-56.
- Hervás, G.; Perez, V.; Giraldez, F.J.; Mantecon, A.R.; Almar, M.M.; Frutos, P. (2003). Intoxication of sheep with quebracho tannin extract. *Journal of Comparative Pathology*. 129:44-54.
- Hess, H.D.; Tiemann, T.T.; Noto, F.; Carulla, J.E.; Kreuzer, M. (2006a). Strategic use of tannins as means to limit methane emission from ruminant livestock. *International Congress Series*. 1293:164-167.
- Hess, H.D.; Tiemann, T.T.; Stürm, C.D.; Carulla, J.E.; Lascano, C.E.; Kreuzer, M. (2006b). Effects of tannins on ruminal degradation and excretory pattern of N and implications for the potential N emission from the manure. *International Congress Series*. 1293:339-342.

- Hoskin, S.O.; Wilson, P.R.; Barry, T.N.; Charleston, W.A.; Waghorn, G.C. (2000). Effect of forage legumes containing condensed tannins on lungworm (*Dictyocaulus sp.*) and gastrointestinal parasitism in young red deer (*Cervus elaphus*). *Research in Veterinary Science*. 68:223-230.
- Hoste, H.; Huby, F.; Mallet, S. (1997a). Strongyloses gastro-intestinales des ruminants : conséquences physiopathologiques et mécanismes pathogéniques. *Parasitologie des ruminants. Le Point Vétérinaire*. 28:53-59.
- Hoste, H.; Chartier, C. (1997b). Perspectives de lutte contre les strongyloses gastro-intestinales. *Le Point Vétérinaire*. 28:181-1187.
- Hoste, H.; Chartier, C.; Le Frileux, Y.; Goudeau, C.; Broqua, C.; Pors, I.; Bergeaud, J.P.; Dorchies, P. (2002). Targeted application of anthelmintics to control trichostrongylosis in dairy goats: result from a 2-year survey in farms. *Veterinary Parasitology*. 110:101-108.
- Hoste, H.; Torres-Acosta, J.F.; Paolini, V.; Aguilar-Caballero, A.; Etter, E.; Lefrileux, Y.; Chartier, C.; Broqua, C. (2005). Interaction between nutrition and gastrointestinal infections with parasitic nematodes in goats. *Small Ruminant Research*. 60:141-151.
- Hoste, H.; Jackson, F.; Athanasiadou, S.; Thamsborg, S M.; Hoskin, S O. (2006). The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology*. 22:253-261.
- Hoste, H.; Torres-Acosta, J.F.J.; Aguilar-Caballero, A.J. (2008). Nutrition-parasite interactions in goats: is immunoregulation involved in the control of gastrointestinal nematodes? *Parasitology Immunology*. 30:79-88.
- Houzangbe-Adote S. (2001). L'élevage face à la pharmacopée en médecine vétérinaire au sud du Bénin. *Bulletin de la recherche agronomique du Bénin*. 33:1-9.
- Hunt, P.W.; McEwan, J.C.; Miller, J.E. (2008). Future perspectives for the implementation of genetic markers on parasite resistance in sheep. *Tropical Biomedicine*. 25:18-33.
- Iqbal, Z.; Sarwar, M.; Jabbar, A.; Ahmed, S.; Nisa, M.; Sohail-Sajid, M.; Nisar-Khan, M.; Aftab-Mueti, K.; Yaseen, M. (2007). Direct and indirect anthelmintic effect of condensed tannins in sheep. *Veterinary Parasitology*. 144:125-131.
- Jackson, F.; Coop, R.L. (2000). The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology* 120:95-97.
- Jackson, F.; Miller, J. (2006). Alternative approaches to control: Quo vadit ? *Veterinary Parasitology*. 139:371-384.
- Jackson, F.; Bartley, D.; Bartley, Y.; Kenyon, F. (2009). Worm control in sheep in the future. *Small Ruminant Research*. 86:40-45.
- Jacquiet, Ph. (1997). Les strongles digestifs des ruminants. En : *Parasitologie de ruminants. Le point vétérinaire*. 28:20-22.
- Jean-Blain, C. (1998). Aspects nutritionnels et toxicologiques des tanins. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 149:911-920.
- Jog, M.; Watve, M. (2005). Role of parasites and commensals in shaping host behaviour. *Current Science*. 89:1184-1191.

- Jones, W.T.; Mangan, W.T. (1977). Complexes of the condensed tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia scop.*) with fraction 1 leaf protein and with submaxillary mucoprotein, and their reversal by polyethylene glycol and pH. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 28:126-136
- Jones, G.A.; McAllister, T.A.; Muir, A.D.; Cheng, K.J. (1994). Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia Scop.*) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 60:1374-1378.
- Jung, Y.D.; Ellis, L.M. (2001). Inhibition of tumour evasion and angiogenesis by epigallocatechin gallate (EGCG), a major component of green tea. *International Journal of Experimental Pathology*. 82:309-316.
- Kaplan, R.M. (2004). Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology*. 20:477-481
- 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.
- Kahn, I.P.; Díaz-Hernández, A. (2000). Tannins with anthelmintic properties. *Proceedings of an International Workshop*. Australia. Pp. 130-138.
- Ketzis, J.K.; Vercruysse, J.; Stromberg, B. E.; Larsen, M.; Athanasiadou, S.; Houdijk, J. G.M. (2006). Evaluation of efficacy expectations for novel and non-chemical helminth control strategies in ruminants. *Veterinary Parasitology*. 139:321-335.
- Koupai-Abyazani, M.R.; Muir, A.D.; Bohm, B.A.; Towers, G.H.N.; Gruber, M.Y. (1993). The proanthocyanidin polymers in some species of *Onobrychis*. *Phytochemistry*. 34:113-117.
- 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.
- Landau, S.; Silanikove, N.; Nitsan, Z.; Barkai, D.; Baram, H.; Provenza, F.D.; Perevolotsky, A. (2000). Short-term changes in eating patterns explain the effects of condensed tannins on feed intake in heifers. *Applied Animal Behaviour Science*. 69:199-213.
- Larsen, M. (1999). Biological control of helminths. *International Journal of Parasitology*. 29:139-146.
- Leathwick, D.M.; Athkinson, D.S. (1996). Influence of different proportions of *Lotus corniculatus* in the diet of lambs on dags, flystrike and animal performance. En: *New Zealand Society of Animal Production*, Pp. 99-102.
- Lee, D. (2002). *The Biology of Nematodes*. CRC Press. Boca Raton, Florida U.S.A. Pp. 1-60.
- LeJambre, L.F.; Windon, R.G.; Smith, W.D. (2008). Vaccination against *Haemonchus contortus*: Performance of native parasite gut membrane glycoproteins in Merino lambs grazing contaminated pasture. *Veterinary Parasitology*. 153:302-312.
- Lim, Y.Y.; Lim, T.T.; Tee, J.J. (2007). Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chemistry*. 103:1003-1008.
- Lin, J.L.; Weng, M.S. (2006). Flavonoids as Nutraceuticals. En: *The Science of Flavonoids*. Grotewold, E. Edit. Springer. USA. Pp. 213-238.
- Lisonbee, L.D.; Villalba, J.J.; Provenza, F.D.; Hall, J.O. (2009). Tannins and self-medication: Implications for sustainable parasite control in herbivores. *Behavioural Processes*. 82:184-189.

- Lowry, J.B.; McSweeney, C.S.; Palmer, B. (1996). Changing perceptions of the effect of plant phenolics on nutrient supply on the ruminant. *Australian Journal of Agriculture Research*. 47:829-842.
- Luque, A.; Barry, T.N.; Mc Nabb, W.C.; Kemp, P.D.; Mc Donald, M.F. (2000). The effect of grazing *Lotus corniculatus* during summer-autumn on reproductive efficiency and wool production in ewes. *Australian Journal of Agriculture Research*. 51:385-391.
- Maasdorpa, B.V.; Muchenje, V.; Titterton, M. (1999). Palatability and effect on dairy cow milk yield of dried fodder from the forage trees *Acacia boliviana*, *Calliandra calothyrsus* and *Leucaena leucocephala*. *Animal Feed Science and Technology*. 77:49-59.
- Maciel, M.V.; Morais, S.M.; Bevilaqua, C.M.L.; Camurca-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.
- Makkar, H.P.; Dawra, R.K.; Singh, B. (1991). Tannin levels in leaves of some oak species at different stages of maturity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 54:513-519.
- Makkar, H.P.S. (2000). Quantification of tannins in tree foliage: Working document. En: FAO/ IAEA, Vienna.
- Makkar, H.P.S. (2003). Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*. 49:241-256.
- Makkar, H. (2006). Chemical and biological assays for quantification of major plant secondary metabolites. BSAS Publication 34. En: C. Sandoval-Castro, F. D. Howell, J. J. Torres-Acosta, & A. Ayala-Burgos (Eds.), *The assessment of intake, digestibility and the roles of secondary compounds*. Nottingham University Press. Pp. 235-249.
- 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.
- Marais, J.P.J.; Mueller-Harvey, I.; Brandt, E.V.; Ferreira, D. (2000). Polyphenols, condensed tannins and other natural products in *Onobrychis viciifolia* (sainfoin). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 48:3440-3447.
- Martínez-Ortiz-de-Montellano, C.; Vargas-Magaña, J.J.; Aguilar-Caballero, A.J.; Sandoval-Castro, C.A.; Cob-Galera, L.; May-Martínez, M.; Miranda-Soberanis, R.; Hoste, H.; Cámara Sarmiento, R.; Torres-Acosta, J.F. (2007). Combining the effects of supplementary feeding and copper oxide needles for the control of gastrointestinal nematodes in browsing goats. *Veterinary Parasitology*. 146:66-76.
- Max, R.A.; Kassuku, A.A.; Kimambo, A.E.; Mtenga, L.A.; Wakelin, D.; Buttery, P.J. (2009). The effect of wattle tannin drenches on gastrointestinal nematodes of tropical sheep and goats during experimental and natural infections. *Journal of Agriculture Science*. 147:211-218.
- Mbhata, K.R.; Downs, C.T.; Nsahlai, I.V. (2002). The effect of graded levels of dietary tannin on the epithelial tissue of the gastro-intestinal tract and liver and kidney masses of boer goats. *Animal Science*. 74:579-586.
- McLeod, M.N. (1974). Plant-tannins their role in forage quality. *Nutrition Abstracts and Reviews*. 44:803-814.
- McNabb, W.C.; Waghorn, G.; Barry, T.N.; Shelton, I.D. (1993). The effect of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on the digestion and metabolism of methionine, cystine and inorganic sulphur in sheep. *British Journal of Nutrition*. 70:647-661.

- McSweeney, C.S.; Palmer, B.; Mc Neill, D.M.; Krause, D.O. (2001). Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 91:83-93.
- McSweeney, C.S.; Collins, E.M.C.; Blackall, L.L.; Seawright, A.A. (2008). A review of anti-antinutritive factors limiting potential use of *Acacia angustissima* as a ruminant feed. *Animal Feed Science and Technology*. 147:158-171.
- Meany, M.; Allister, J.; McKinstry, B.; McLaughlin, K.; Brennan, G.P.; Forbes, A.B.; Fairweather, I. (2007). *Fasciola hepatica*: ultrastructural effects of combination of tricabendazole and clorsulon against mature fluke. *Parásitology Research*. 100:1091-1104.
- Mendéz-Ortíz, F.A. (2009). Efectos de la inclusión de *Havardia albicans* sobre el consumo, digestibilidad de la dieta y carga parasitaria de *Haemonchus contortus* en ovinos de pelo. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, México.
- Meyvis, Y.; Geldhof, P.; Gevaert, K.; Timmerman, E.; Vercruyse, J.; Claerebout, E. (2007). Vaccination against *Ostertagia ostertagi* with subfractions of the protective ES-thiol fraction. *Veterinary Parasitology*. 149:239-245.
- Min, B.R.; Barry, T. N.; Attwood, G. T.; McNabb, W. C. (2003). The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 106:3-19.
- Min, B.R.; Hart, S. P. (2002). Tannins for suppression of internal parasites. *Journal Animal Science*. 81:102-109.
- Minho, A.P.; Bueno, I.C.S.; Louvandini, H.; Jackson, F.; Gennari, S.M.; Abdalla, A.L. (2008). Effect of *Acacia molissima* tannin extract on the control of gastrointestinal parasites in sheep. *Animal Feed Science and Technology*. 147:172-181.
- Molan, A.L.; Alexander, R.A.; Brookes, I.M.; McNabb, W. C. (2000a). Effect of an extract from *Sulla* (*Hedysarum coronarium*) containing condensed tannins on the migration of three sheep gastrointestinal nematodes *in vitro*. *Proceedings of New Zeland Society of Animal Production*. 60:21-25.
- Molan, A.L.; Waghorn, G.C.; Min, B.R.; McNabb, W.C. (2000b). The effect of condensed tannins from seven herbage on *Trichostrongylus colubriformis* larval migration *in vitro*. *Folia Parasitologica*. 47:39-44.
- Molan, A.L.; Hoskin, S.O.; Barry, T.N.; McNabb, W.C. (2000c). Effect of condensed tannins from four forages on the viability of the larvae of deer lungworms and gastrointestinal nematodes. *Veterinary Record*. 147:44-48.
- Molan, A.L.; Meagher, L.P.; Spencer, P.A.; Sivakumaran, S. (2003a). Effect of flavan-3ols on *in vitro* egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. *International Journal of Parasitology*. 33:1691-1698.
- Molan, A.; Duncan, A.; Barry, T.; McNabb, W. (2003b). Effects of condensed tannins and crude sesquiterpene lactones extracted from chicory on the motility of larvae of deer lungworm and gastrointestinal nematodes. *Parásitology*. 52:209-218.
- Molle, G.; Decandia, M.; Fois, S.; Ligios, S.; Cabiddu, A.; Sitzia, M. (2003). The performance of Mediterranean dairy sheep given access to *sulla* (*Hedysarum coronarium* L.) and annual ryegrass (*Lolium rigidum* Gaudin) pastures in different time proportions. *Small Ruminant Research*. 49:319-328.
- Montalvo-Aguilar, X.; López-Arellano, M.E.; Vázquez-Prats, V.; Liébano-Hernández, E.; Mendoza de Guives, P. (2006). Resistencia antihelmíntica de nemátodos gastroentéricos en ovinos a febendazol e ivermectina en la región noreste del estado de Tlaxcala. *Técnica Pecuaria México*. 44:81-90.

- Mottier, L.; Lanusse, C. (2001). Bases moleculares de la resistencia a fármacos antihelmínticos. *Revista Médica Veterinaria*. 82:74-85.
- Mottier, L.; Alvarez, L.; Ceballos, C.; Lanusse, C. (2006). Drug transport mechanisms in helminth parasites: Passive diffusion of benzimidazole anthelmintics. *Experimental Parasitology*. 113:49-57.
- Moore, K.M.; Barry, T.N.; Cameron, P.N.; Lopez-Villalobos, N.; Cameron, D.J. (2003). Willow (*Salix sp.*) as a supplement for grazing cattle under drought conditions. *Animal Feed Science and Technology*. 104:1-11.
- Mueller-Harvey, I.; McAllan, A.B. (1992). Tannins: their biochemistry and nutritional properties. *Advances in Plant Cell Biochemistry and Biotechnology*. 1:151-217.
- Mueller-Harvey, I. (2006). Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86:2010-2037.
- Norton, B.W. (1999). The significance of tannins in tropical animal production. En: *Tannins in livestock and human nutrition*, ACIAR proceedings N.92 (BROOKER, ed.), Adelaide, Australia, Pp. 14-23.
- Ojeda-Robertos, N.F.; Mendoza De Gives, P.; Torres-Acosta, J.F.J.; Rodríguez-Vivas, R.I.; Aguilar-Caballero, A. J. (2005). Evaluating the effectiveness of a Mexican strain of *Duddingtonia flagrans* as a biological control agent against gastrointestinal nematodes in goat faeces. *Journal of Helminthology*. 79:151-157.
- Ojeda-Robertos, N.F.; Torres-Acosta, J.F.J.; Aguilar-Caballero, A. J.; Ayala-Burgos, A.; Cob-Galera, L.A.; Sandoval-Castro, C.A.; Barrientos-Medina, R.C.; Mendoza De Gives, P. (2008). Assessing the efficacy of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores per gram of faeces to control *Haemonchus contortus* larvae. *Veterinary Parasitology*. 158:329-335.
- Okuda, T. (2005). Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*. 66:2012-2031.
- Paolini, V.; Fouraste, I.; Hoste, H. (2003a). In vitro effects of three woody plant and sainfoin extracts on 3rd-stage larvae and adult worms of three gastrointestinal nematodes. *Parasitology*. 129:67-77.
- Paolini, V.; Bergaud, J.P.; Grisez, C.; Prevot, F.; Dorchies, Ph.; Hoste, H. (2003b). Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 113 :253-261.
- Paolini, V. (2004). Effets des tanins condensés sur le parasitisme par les nématodes gastro-intestinaux chez la chèvre. Thèse de Doctorat. Université de Perpignan, France.
- Paolini, V. ; Fouraste I. ; Hoste, H. (2004). *In vitro* effects of three woody plant and sainfoin extracts on third-stage larvae and adult worms of three gastrointestinal nematodes. *Parasitology*. 129:67-77.
- Paraud, C. ; Hoste, H.; Lefrileux, Y.; Pommaret, A.; Paolini, V.; Pors, I. ; Chartier, C. (2005). Administration of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to goats to control gastro-intestinal nematodes: doses trials. *Veterinary Research*. 36:157-166.
- Pechenik, J.A. (1999). The Nematodes. En: *Biology of the Invertebrates*. 4th. Editon. McGraw-Hill. Pp. 409-427.
- Pell, A.N.; Woolston, T.K.; Nelson, K.E.; Schofield, P. (1999). Tannins: biological activity and bacterial tolerance. En: *Tannins in livestock and human nutrition*. ACIAR Proceedings (BROOKER, ed.). Canberra, Australia.

- Perron, N.R.; Brumaghim, J.L. (2009). A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochemistry Biophysics*. 53:75-100.
- Poncet-Legrand, C.; Edelmann, A.; Putaux, J.L.; Cartalade, D.; Sarni-Manchado, P.; Vernhet, A. (2006). Poly (L-proline) interactions with flavan-3-ols units: influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. *Food Hydrocolloids*. 20:687-697.
- Prichard, R.K. (2002). Resistance Against Macrocytic Lactones. En: *Macrocytic Lactones in Antiparasitic Therapy*. Edit. Vercruyse, J.; Rew, R.S. CAB International. p.164.
- Provenza, F.D.; Villalba, J.J.; Dziba, L.E.; S.B., A.; Banner, R.E. (2003). Linking herbivore experience, varied diets, and plant biochemical diversity. *Small Ruminant Research*. 49:257-274.
- Provenza, F.D. (2006). Behavioral mechanisms influencing use plants with secondary metabolites by herbivores. In: Sandoval-Castro, C.A., Hovell, F.D. DeB., Torres-Acosta, J.F.J., Ayala-Burgos, A. (Eds), *Herbivores: The assessment of intake, digestibility and the roles of secondary compounds*. Nottingham University Press, Nottingham, Pp. 183-195.
- Provenza, F.D.; Villalba, J.J. (2010). The role of natural plant products in modulating the immune system: An adaptable approach for combating disease in grazing animals. *Small Ruminant Research* 89:131-139.
- Ramírez-Restrepo, C.A.; Barry, T.N. (2005). Alternative temperate forages containing secondary compounds for improving sustainable productivity in grazing ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 120:179-201.
- Reed, J.D. (1995). Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal Animal Science*. 73:1516-1528.
- Richelle, M.; Tavazzi, I.; Offord, E. (2001). Comparison of the antioxidant activity of commonly beverages (coffee, cacao, and tea) prepared per cup serving. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 49:3438-3442.
- Ríos-De Alvarez, L.; Greer, A.W.; Jackson, F.; Athanasiadou, S.; Kyriazakis, I.; Huntley, J.F. (2008). The effect of dietary Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on local cellular responses to *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Parasitology*. 135:117-1124.
- Rochfort, S.; Parker, A.J.; Dunshea, F.R. (2008). Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry*. 69:299-322.
- Rodríguez-Vivas, I.; Cob-Galera, L.; Domínguez-Alpizar, J.L. (2001). Frecuencia de parásitos gastrointestinales en animales domésticos diagnosticados en Yucatán, México. *Revista Biomedica*. 12:19-23.
- Sandoval-Castro, C.A.; Lizarraga-Sanchez, H.L.; F.J.; S.S. (2005). Assessment of tree fodder preference by cattle using chemical composition, *in vitro* gas production and *in situ* degradability. *Animal Feed Science and Technology*. 123-124:277-289.
- Santamaría-Colonia, N.; Torres-Acosta, J.F.J.; Rodríguez-Vivas, I. (1995). Efecto del peso del destete sobre el parasitismo gastrointestinal en cabritos en clima tropical. *Revista Biomedica*. 6:143-150.
- Simón-Vicente, F.; Simón-Martín, F. (1999). Nemátodos. En: *Parasitología Veterinaria*. Cordero del Campillos, M.; Rojo Vázquez, F.A. Edit. McGraw-Hill Interamericana. Pp. 113-123.
- Schofield, P.; Mbugua, D.M.; Pell, A.N. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 91:21-40.

- Smith, W.D. (1999). Prospect for vaccines of helminth parasites of grazing ruminants. *International Journal of Parasitology*. 29:17-24.
- Smith, W.D. (2008). Recent vaccine related studies with economically important gastrointestinal nematode parasites of ruminants. *Tropical Biomedicine*. 25:50-55.
- Smith, W.D.; Taylor, S. (2009). Twists and turns en route to a vaccine for *Haemonchus contortus*. En: *Memorias de la World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*. Del 11 al 13 de Agosto de 2009. Calgary, Canada. p. 56.
- Song, J.H.; Kim, S.K.; Chang, K.W.; Han, S.K.; Yi, H.K.; Jeon, J.G. (2006). *In vitro* inhibitory effects of *Polygonum cuspidatum* on bacterial viability and virulence factors of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Archives Oral Biology* 51:1131-1140.
- Song, J.M.; Lee, K.H.; Seong, B.L. (2005). Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral Research*. 68:66-74.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (2007). *Fisiología Vegetal*. Vol. I. Publicacions Universitat Jaume. p. 557.
- Terrill, T.H.; Douglas, G.B.; Foote, A.G.; Purchas, R.W.; Wilson, G.F.; Barry, T.N. (1992a). Effects of condensed tannins upon body growth, wool growth and rumen metabolism in sheep grazing sulla (*Hedysarum coronarium*) and perennial pasture. *Journal of Agriculture Science*. 119:265-273.
- Terrill, T.H.; Rowan, A.M.; Douglas, G.B.; Barry, T.N. (1992b). Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein meals and cereal grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 58:321-329.
- Theodorou, M.K.; Barahona, R.; Kingston-Smith, A.; Sanchez, S.; Lascano, C.; Owen, E.; Morris, C. (1999). News perspectives on the degradation of plant biomass in the rumen in the absence and presence of condensed tannins. En: *Tannins in livestock and human nutrition*. ACIAR Proceedings (BROOKER, ed.), Camberra, Australia.
- Torres-Acosta, J.F. (1999). Supplementary feeding and the control of gastrointestinal nematodes of goats in Yucatan. The Royal Veterinary College. University of London, London, U.K.
- Torres-Acosta, J.F.; Dzul-Canche, R.; Aguilar-Caballero, A.; Rodríguez-Vivas, I. (2003a). Prevalence of gastrointestinal nematodes resistant to benzimidazoles in sheep herds of Yucatan, Mexico. *Veterinary Parasitology*. 114:33-42.
- Torres-Acosta, J.F.; Roberts, B.; Canto-Dorantes, J.; Martínez-Ortiz de Montellano, C.; Rodríguez, J.; Canul-Ku, H.L.; Tirado-Muñoz, F.; Aguilar-Caballero, A. (2003b). Prevalence of sheep herds with gastrointestinal nematodes resistant to benzimidazoles, imidazothaisoles and macrocyclic lactones in Yucatan. En: *Proceedings of the V International Seminar in Animal Parasitology*, Pp. 48-52.
- Torres-Acosta, J.F.; Villaroel-Alvarez, M.S.; Rodríguez-Arevalo, F.J.; Gutiérrez-Segura, I.; Alonso-Díaz, M. (2003c). Diagnóstico de nemátodos gastrointestinales resistentes a benzimidazoles e imidaizotiazoles en un rebaño caprino de Yucatán, México. *Revista Biomedicina*. 14:75-81.
- Torres-Acosta, J.F.; Jacobs, D.E.; Aguilar-Caballero, A.; Sandoval-Castro, C.; May-Martinez, M.; Cob-Galera, L.A. (2004). The effect of supplementary feeding on the resilience and resistance of browsing Criollo kids against natural gastrointestinal nematode infections during the rainy season in tropical Mexico. *Veterinary Parasitology*. 124:217-238.

- Torres-Acosta, J.F.; Aguilar-Caballero, A.; Le Bigot, C.; Hoste, H.; Canul-Ku, H.L.; Santos-Ricalde, R.; Gutierrez-Segura, I. (2005). Comparing different formulae to test gastrointestinal nematode resistance to benzimidazoles in smallholder goat farms in Mexico. *Veterinary Parasitology*. 134:241-248.
- Torres-Acosta, J.F.J.; Jacobs, D.E.; Aguilar-Caballero, A.J.; Sandoval-Castro, C.; Cob-Galera, L.A.; May-Martínez, M. (2006). Improving resilience against natural gastrointestinal nematodes infections in browsing kids during the dry season in tropical Mexico. *Veterinary Parasitology*. 135:163-173.
- Torres-Acosta J.F.J.; López-Cervantes C.; Martínez-Ortiz de Montellano C.; Cámara-Sarmiento R.; Rodríguez J.; Canul-Ku H.L.; Tirado-Muñoz F.; Aguilar-Caballero A.J.; Roberts B. (2007). Prevalence of sheep farms with anthelmintic resistant nematodes in two states of Topical México. From Alaska to Chiapas: The First North American Parasitology Congress. American Society of Parasitology, Sociedad Mexicana de Parasitología & Parasitology section of the Canadian society of Zoologist. June 21-25, Mérida, Yucatán, México. Pp. 136-137.
- Torres-Acosta, J.F.J.; Hoste, H. (2008). Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Ruminant Research*. 77:159-173.
- Van Wyk, J.A.; Stenson, M.O.; Van Der Merwe, J.S.; Vorster, R.J.; Viljoen, P.G. (1999). Anthelmintic resistance in South Africa: surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. *Journal of Veterinary Research*. 66:273-284.
- 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.
- Van Wyk, J.A.; Hoste, H.; Kaplan, R.M.; Besier, R.B. (2006). Targeted selective treatment for worm management - How do we sell rational programs to farmers? *Veterinary Parasitology*. 139:336-346.
- Venéreo-Gutiérrez, J.R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana Militar*. 31: 126-133.
- Vercruyse, J.; Rew, R. (2002). General Efficacy of the Macrocytic Lactones to Control Parasites of Cattle. En: *Macrocytic Lactones in Antiparasitic Therapy*. Edit. Vercruyse, J.; Rew, R.S. CAB International. Pp. 185-199.
- Villalba, J.J.; Provenza, F.D. (2007). Self-medication and homeostatic behavior in herbivores: learning about the benefits of nature's pharmacy. *Animal*. 9:1360-1370.
- Waghorn, G.; Ulyatt, M.J.; John, A.; Fisher, M.T. (1987). The effect of condensed tannins on the site of digestion of amino acids and other nutrients in sheep fed on *Lotus corniculatus*. *British Journal of Nutrition*. 57:115-26.
- Waghorn, G.; Shelton, I.D.; Mc Nabb, W.C. (1994a). Effect of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on its value for sheep 1. Non-nitrogenous aspect. *Journal of Agriculture Science*. 123:99-107.
- Waghorn, G.; Shelton, I.D.; Mc Nabb, W.C.; Mccutcheon, S.N. (1994b). Effects of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on its value for sheep 1. Non-nitrogenous aspect. *Journal of Agriculture Science*. 123:109-119.
- Waghorn, G.; Mc Nabb, W.C. (2003). Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. *Proceedings of Nutrition Society*. 62:383-392.
- Waghorn, T.S.; Molan, A.L.; Deighton, M.; Alexander, R.A.; Leathwick, D.M.; Mc Nabb, W.C.; Meagher, L.P. (2006). *In vivo* anthelmintic activity of *Dorycnium rectum* and grape seed extract against *Ostertagia (Teladorsagia) circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *The New Zeland Veterinary Journal*. 54:21-27.

- Waghorn, G. (2008). Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production-Progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology*. 174:116-139.
- Waterman, P.G. (1999). The tannins - An overview. En: *Tannins in Livestock and Human Nutrition*. Proceedings of an International Workshop, BROOKER (Ed.), Adelaide, Australia, Pp. 10-13.
- Weisshaar, B.; Jenkins, G.J. (1998). Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Current Opinion Plant Biology*. 1:251-257.
- Woodward, A.; Coppock, D.L. (1995). Role of plant defence in the utilization of native browse in southern Ethiopia. *Agroforestry Systems*. 32:147-161.
- Yamaguchi, K.; Honda, M.; Ikigai, H.; Hara, Y.; Shimamura, T. (2002). Inhibitory effects of epigallocatechin gallate on the life cycle of human immunodeficiency virus type 1(HIV-1). *Antiviral Research*. 53:19-34.
- Zimmer, N.; Cordesse, R. (1996). Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *INRA Production Animale*. 9:167-179.
- Zintz, K.; Frank, W. (1982). Ultrastructural modifications in *Heterakis spumosa* after treatment with febantel or mebendazole. *Veterinary Parasitology*. 10:47-56.

6. ARTÍCULOS

ARTÍCULO 1

EFFECT OF A TROPICAL TANNIN-RICH PLANT *LYSILOMA LATISILIQUUM* ON ADULT POPULATIONS OF *HAEMONCHUS CONTORTUS* IN SHEEP.

ARTÍCULO PUBLICADO EN LA REVISTA “VETERINARY PARASITOLOGY”



Effect of a tropical tannin-rich plant *Lysiloma latisiliquum* on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep

C. Martínez-Ortíz-de-Montellano^{a,b,c}, J.J. Vargas-Magaña^d, H.L. Canul-Ku^c,
R. Miranda-Soberanis^c, C. Capetillo-Leal^c, C.A. Sandoval-Castro^c,
H. Hoste^{a,b}, J.F.J. Torres-Acosta^{c,*}

^a INRA UMR 1225, F-31076 Toulouse Cedex, France

^b Université de Toulouse, ENVT, UMR 1225, F-31076 Toulouse, France

^c Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Km 15.5 carretera Mérida-Xmatkuil, Mérida, Yucatán, Mexico

^d Escuela Superior de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Campeche, C. 53 s/n Escárcega, Campeche, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 December 2009

Received in revised form 14 March 2010

Accepted 30 April 2010

Keywords:

Haemonchus contortus

Adult worms

Tannins-rich legumes

Lysiloma latisiliquum

Hair sheep

ABSTRACT

Bioactive plants with anthelmintic (AH) properties represent a promising alternative solution to chemical treatments. The AH effect of several Mexican tannin-rich (TR) plants has been screened *in vitro*. The *in vivo* AH effect of one TR legume, *Lysiloma latisiliquum* (Tzalam) on nematode larval establishment was confirmed. The present trial aimed at evaluating the direct and indirect effects of *L. latisiliquum* fodder consumption on adult *Haemonchus contortus*. Twenty-two parasite-naïve hair sheep lambs were allocated to an infected group (I) (400 *H. contortus* L₃/kg BW on D0) and a non-infected group (NI). From D0 to D28 post infection (PI), all the lambs were fed a complete diet. On D28, the two groups were subdivided into four groups. Two control (C) groups maintained on the original basal diet (CI: 6 infected lambs and CNI: 5 non-infected lambs). The two treatment groups (T) received *L. latisiliquum* fodder *ad libitum* up to D36 when lambs were humanely slaughtered (TI: 6 infected lambs and TNI: 5 non-infected lambs). From D28 to D36 PI, individual fodder consumption and nematode egg excretion were measured daily. At necropsy, abomasal contents were recovered to obtain worm burdens and measure the female worm length and fecundity. Histological samples were taken from the respective abomasums and small intestines to count mucosal inflammatory cells. An increased consumption of TR fodder was observed in the TI vs. the TNI group ($P < 0.01$). Before *L. latisiliquum* distribution, faecal egg excretion was similar in TI and CI groups. From D29 PI the TI group showed lower faecal egg counts compared to CI group ($P < 0.02$). Although no differences in worm burdens were observed, worms of the TI group were smaller and, according to their size, contained fewer eggs *in utero* than worms from the CI group ($P < 0.05$). Only minor differences in mucosal inflammatory cells were observed between groups, indicating that the indirect effect was not evident. Thus, a short-term consumption of *L. latisiliquum* can modulate directly the biology of adult *H. contortus* affecting the worm size and female fecundity while the worm burdens were not affected. Infected animals ate more *L. latisiliquum* fodder than non-infected animals.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author at: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Small Ruminants Production and Health, Km 15.5 carretera Mérida-Xmatkuil, 97000 Mérida, Yucatán, Mexico. Tel.: +52 999 943 3222/942 3200; fax: +52 999 942 3205.

E-mail address: tacosta@uady.mx (J.F.J. Torres-Acosta).

1. Introduction

An increasing interest has developed for alternative methods to reduce the dependence on commercial treatments (Torres-Acosta and Hoste, 2008). The use of bioactive plants is one of these alternatives. Tannin-rich (TR) plants have been the most largely studied group of bioactive plants in veterinary medicine (see reviews by Min et al., 2003; Ramírez-Restrepo and Barry, 2005; Hoste et al., 2006, 2008). *In vivo* studies have shown that the anthelmintic (AH) effect related with the consumption of TR plants vary depending on the parasitic species (Niezen et al., 1996; Athanasiadou et al., 2001; Paolini et al., 2003a,b) or the parasitic stages (Paolini et al., 2003a,b). The main described effect when infective third-stage larvae are submitted to the action of TR plants was a reduction of L₃ establishment (Paolini et al., 2003a,b; Tzamaloukas et al., 2006). In contrast, the main consequence on adult worm populations appeared to be significant reductions in nematode egg excretion, due to either a reduction in worm burdens and/or the fecundity of female worms (Paolini et al., 2003c, 2005; Shaik et al., 2004; Heckendorn et al., 2007).

In vitro screenings have revealed the potential AH properties of several tropical legumes (Hammond et al., 1997; Shelton, 2000; Cresswell, 2007; Hoste et al., 2008) including several species found in the Mexican tropical forests (*Acacia pennatula*, *Acacia gaudieri*, *Havardia albicans*, *Piscidia piscipula*, *Lysiloma latisiliquum* and *Leucaena leucocephala*) (Alonso-Díaz et al., 2008a,b; Hernández-Orduño et al., 2008). However, *in vivo* studies remain few, with the noticeable exception of different *Acacia* species (Kahiya et al., 2003; Cenci et al., 2007; Akkari et al., 2007, 2008; Minhó et al., 2008; Max et al., 2004, 2009). *L. latisiliquum* (Mayan name: Tzalam) is widely distributed in tropical areas of America (Flores-Guido, 2001). Earlier *in vivo* results using *L. latisiliquum* fodder showed a reduction of the establishment of both *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* L₃ larvae in goats (Brunet et al., 2008a). Consequences on adult worm populations have not been explored yet. The present trial examined the effect of *L. latisiliquum* consumption on adult *H. contortus* populations in sheep and the concomitant changes in the cellular responses in the gastrointestinal mucosae in order to address the question of the direct vs. indirect mode of action of TR plants on nematodes.

2. Materials and methods

2.1. Infective larvae

Third-stage larvae of *H. contortus* were obtained from donor sheep infected with a pure strain (CENID-INIFAP, sheep strain, México). The larvae were stored at 4 °C before use. The same batch of 3-month-old larvae was used in the assay.

2.2. Experimental design

The experiment was performed at the FMVZ-UADY (20°52'N, 88°37'W) during January–March 2008. Twenty-two, 2-month-old naïve male Pelibuey lambs

(10.41 ± 1.87 kg BW) were used. The lambs were raised indoors on concrete floor pens to avoid nematode infections. All the lambs received injectable levamisole (7.7 mg/kg BW) and oral albendazole (5 mg/kg BW) five days before the start of the experiment (D –5). Lambs were divided into two groups balanced according to their bodyweight.

On D0, 12 lambs were infected with an oral dose of 400 *H. contortus* L₃/kg BW (infected group). The remaining 12 lambs were kept free of infection (non-infected group).

From D0 to D28 both, the infected and the non-infected lambs, received water and 60 g/kg BW of a balanced tannin-free diet. The experimental diet was made with maize grain, soybean meal, sugar cane molasses, wheat bran and a mineral mix (18.8% crude protein and 10.8 MJ/kg). The feed was distributed daily in the morning.

On D28, when the presence of adult *H. contortus* worms was confirmed in the infected group (presence of nematode eggs in faeces). Then, the two groups were sub-divided into four sub-groups:

- Two control groups, either infected (CI, 6 lambs) or non-infected (CNI, 5 lambs), were maintained only on the basic diet mentioned above (60 g/kg BW).
- Two treated groups, an infected (TI, 6 lambs) and a non-infected (TNI, 5 lambs) group, received 800 g of *L. latisiliquum* fresh fodder (D28–D36 PI) and 30 g/kg BW of the balanced tannin free diet. The quantity of fodder offered to the animals was determined from a previous trial (Brunet et al., 2008a) aiming at an *ad libitum* scheme.

The basic diet was offered individually at 8:00 AM and the feed was totally consumed daily (no refusals left).

The *L. latisiliquum* fodder was “cut and carry” every day from five selected local trees (5 kg/tree daily). Prior to feeding, all the fodder was mixed to obtain a homogenous distribution of tannin contents. The fodder was offered in the same individual troughs as the basal diet (11:00 AM). Daily consumption of fresh fodder was estimated from individual refusals of TNI and TI animals.

The lambs of group TI were placed in individual metabolic cages from D0. Meanwhile, animals in group TNI were placed in concrete floor pens with the same dimension of the metabolic cages and were moved to metabolic cages from D28 PI until the end of the trial on D36.

2.3. Nutritional analysis

During the second experimental period, daily samples of fresh fodder of *L. latisiliquum* and pooled samples of the balanced tannin free diet were collected and dried separately at 60 °C for 72 h. A pooled sample of the balanced tannin free diet and two samples of the *L. latisiliquum* (D32 and D35 PI) were analyzed using official procedures for dry matter (DM; 7.007), ash (7.009), crude protein (CP; 2.057), fat (EE) according to the AOAC procedures (1980). In addition, neutral detergent fibre (NDF), acid detergent fibre (ADF) and lignin were determined according to Van Soest et al. (1991).

On three day samples of *L. latisiliquum* fodder (D29, D32 and D35 PI), the total phenol (TP) and total tannin

(TT) contents were determined using the Folin–Ciocalteu assay (Makkar, 2003) and the condensed tannin (CT) contents were measured using the Vanillin assay (Price et al., 1978). The biological activity (BA) (Hagerman, 1992) of *L. latisiliquum* fodder was measured on D32 and D35 PI using a modified radial diffusion assay (Hernández-Orduño et al., 2008; Makkar, 2003). The results were expressed as units of protein precipitation activities relative to tannic acid. Measurements of BA were made with four replicates.

2.4. Parasitological techniques

From D18 PI up to the end of the trial, individual faecal samples were collected to measure faecal egg counts (FEC) using a modified McMaster technique with a sugar flotation fluid (specific gravity: 1.27 g/ml) (Raynaud, 1970).

Lambs were humanely slaughtered on D37 PI complying with local regulations on animal welfare. The abomasums were removed and processed immediately after death to collect the worms from the contents and washings. The number of parasites from the lumen was counted based on a 10% aliquot method as reported by Martínez-Ortiz-de-Montellano et al. (2007). The rates of *H. contortus* establishment were calculated as the total number of worms recovered at necropsy divided by the total number of L_3 given, multiplied by 100. The inhibited larvae were not considered in the calculation.

The sex of each worm was recorded and the female/male sex ratio was calculated. Fifty adult female *H. contortus* of each lamb were measured using a calibrated grid adapted to a stereomicroscope (40 \times). Then, adult female *H. contortus* worms were placed in Eppendorf tubes and grounded with a rod to release the eggs from the uterus. Thereafter, the tube was filled with 1 ml of water and the total number of eggs was determined based on a 10% aliquot (fecundity) as follows: five 20 μ l subsamples were placed in a microscope slide and the number of eggs was counted at 100 \times magnification.

2.5. Histological analyses

Histological samples were obtained from the abomasum and small intestine in order to explore the hypothesis that tannins might stimulate or interact in a general way with the different mucosal cells. Also this study investigated possible relationships existing between different digestive mucosae (Emery et al., 1993) or even within the whole mucosal systems (i.e. nasal and digestive systems; Yacob et al., 2002). At necropsy, histological samples were collected from the fundus, the pylorus and the small intestine (duodenum), to determine the number of eosinophils (EOS), globule leukocytes (GL) and goblet cells (GC) in the mucosae, according to Larsen et al. (1994) and Huntley et al. (1995). The mucosal samples were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Sections (5 μ m) were obtained and stained with haematoxylin–eosin (H–E) for counting of EOS and GL, or with Periodic–Acid–Schiff (PAS) reagents for counting of GC. The stained cells were enumerated at 400 \times magnification using a calibrated reticule encompassing an area of 0.25 mm². Mean cell densities for each tissue and each cellular type were obtained from

counts on 10 histological fields randomly selected. The results were expressed as the mean number of cells per field of 0.25 mm² of mucosae.

2.6. Statistical analyses

Daily consumption of fresh *L. latisiliquum* fodder (from D28 to D36 PI) was compared between the TNI and TI groups. The individual fodder consumptions from D29 to D34 were used to calculate the respective mean for the experimental period of each animal (Petrie and Watson, 2006). The TNI and TI groups were compared using the GLM procedure of Minitab 15 (2007).

For the infected groups (TI and CI), the individual FEC from D29 to D34 were used to calculate the respective mean for the experimental period of each animal. Values were then transformed ($\log_{10}(\text{FEC} + 1)$) before being analyzed. The transformed values of FEC on D28 PI ($\log_{10}(\text{FEC} + 1)$) were used as covariate. The TI and CI groups were compared using the GLM procedure of Minitab 15 (2007).

Differences between the TI and the CI groups in terms of the mean worm counts ($\log_{10}(n + 1)$), parasite establishment, female worm lengths and fecundity (eggs *in utero*) values were analyzed using respective *t*-tests with Minitab 15 (2007).

The relationship between female worm lengths and fecundity of the CI group and the TI group were compared using regression analysis. This analysis used the slopes of the two groups to differentiate between worm length and *L. latisiliquum* effects on the female fecundity. This analysis was performed using GraphPad Prism 5 (2007).

The values of the mucosal cell counts (EOS, GL and GC) in the four experimental groups were compared using respective two-way analyses of variance with *post hoc* comparisons using the Bonferroni test.

3. Results

3.1. Plant analyses

The chemical composition (% DM) of *L. latisiliquum* was: 15.12 CP, 8.27 ash, 8.92 EE, 46.75 NDF and 29.14 ADF. The tannin content (% DM, mean \pm S.D.) of the three *L. latisiliquum* samples were TP: 3.38 ± 0.20 , TT: 2.39 ± 0.19 and CT: 5.46 ± 2.17 . Meanwhile the BA was 4.85 ± 1.29 units of protein precipitation in relation to the standard.

3.2. Consumption of fresh fodder and tannins

The sheep in the TI group consumed significantly more fodder than sheep in the TNI group ($P < 0.01$) (Fig. 1). Based on these differences in voluntary feed intake, the daily consumption of tannins and polyphenols from fresh fodder in the TI and TNI groups were: TP (10.40 ± 2.89 and 6.68 ± 2.86 g/day respectively), TT (7.35 ± 1.89 and 4.66 ± 1.74 g/day respectively) and CT (16.12 ± 4.52 and 10.42 ± 4.18 g/day respectively).

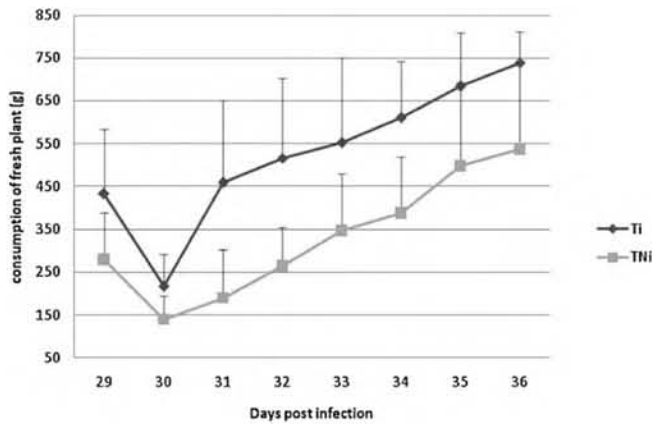


Fig. 1. Daily consumption of fresh fodder of *Lysiloma latisiliquum* in lambs infected with *Haemonchus contortus* (TI) or non-infected (TNI).

3.3. Faecal egg counts

Animals in the infected groups were eliminating similar quantities of worm FEC before D28 PI. Overall, in the second period of the trial, from D29 to D36 PI, the sheep in the TI group shed lower worm egg counts than those in the CI group ($P < 0.02$) (Fig. 2). On D36 PI, the faecal egg excretion was 31% lower in the TI group compared to the CI group.

3.4. Worm burdens and establishment rates

The mean number of worms recovered from the CI group was similar to that in the TI group (720 ± 375.7 vs. 873 ± 772.4 respectively; $P > 0.05$). No significant differences were observed between both infected groups in regard of establishment rates (%) (17.7 ± 0.11 vs. 19.7 ± 0.16 for CI and TI respectively). The parasite sex ratios (female:male) were also similar in the TI (SR = 1.078 ± 0.3501) and the CI (SR = 1.064 ± 0.3005) sheep ($P > 0.05$).

3.5. Female worm length and fecundity

The female worm length was lower in the TI group (1.9 ± 0.22 cm) than in the CI group (2.2 ± 0.17 cm) ($P < 0.05$). In addition, *L. latisiliquum* induced a tendency

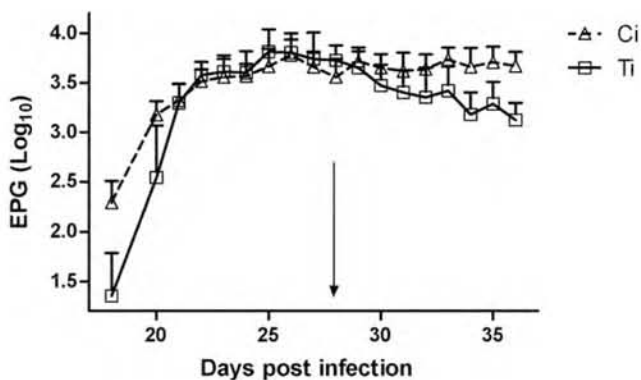


Fig. 2. Mean (\pm SEM) of faecal egg counts ($\log_{10}(\text{EPG}+1)$) in sheep fed *Lysiloma latisiliquum* fodder (tannin-rich diet, TI) and control group (tannin free diet, CI). The black arrow represents the date when the distribution of *L. latisiliquum* started in the TI group.

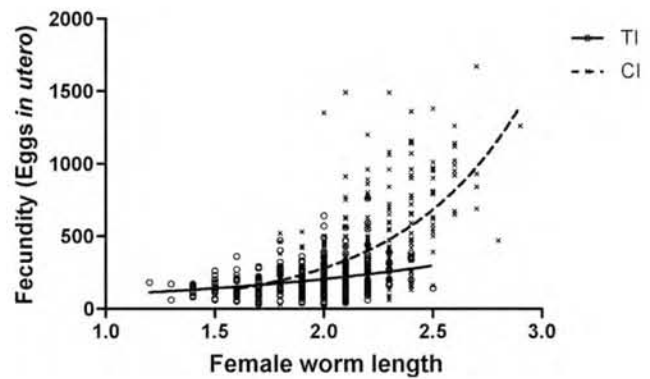


Fig. 3. Relationship between worm length and fecundity of female in *Haemonchus contortus* obtained from *Lysiloma latisiliquum* (TI) and control (CI) lambs ($n = 295$ and 298 worms respectively).

to reduce the number of eggs *in utero* (fecundity) in the *H. contortus* female worms when compared to CI group (192.9 ± 39.4 vs. 424.6 ± 262.0 respectively; $P = 0.06$).

The relationship between female length and fecundity, assessed with exponential growth equations (TI group, $n = 295$ and CI group, $n = 298$), was different for both groups ($P < 0.05$). The results indicated that the worms of the TI group were smaller and according to their size contained fewer eggs *in utero* than the worms from the CI group (Fig. 3).

The relationships were described by the following equations:

$$\text{TI fecundity} = 46.31 (\pm 13.15) \times \exp^{(0.744 (\pm 0.1415) \times L)}$$

$$\text{CI fecundity} = 7.837 (\pm 2.71) \times \exp^{(1.787 (\pm 0.1454) \times L)}$$

where fecundity is the number of eggs *in utero* and L is the worm length in cm.

3.6. Mucosal cellular response

No significant differences were observed between the four experimental groups regarding the cell counts in the mucosae (Fig. 4) except for a tendency to increase the globule leucocyte number in the small intestine of the TI group ($P < 0.06$).

4. Discussion

The mode of action of tannins against adult GIN remains largely debated. Two hypotheses are usually evoked (Kahn and Diaz-Hernandez, 2000; Athanasiadou et al., 2001; Hoste et al., 2006). The first one suggests the possible direct effects of tannins, on nematodes which are related to their ability to form complexes and create interactions with parasite proteins (Mueller-Harvey, 2006). This hypothesis is supported by most *in vitro* results and by a few short-term *in vivo* studies (Athanasiadou et al., 2001, 2005; Tzamaloukas et al., 2006). On the other hand, the second hypothesis suggests that tannins might affect indirectly the nematode biology through an improvement of the host's immune response (Kahn and Diaz-Hernandez, 2000; Hoste et al., 2006). This could be related to the increased intestinal flow and absorption of proteins and amino acids resulting from the lower degree of protein ruminal degra-

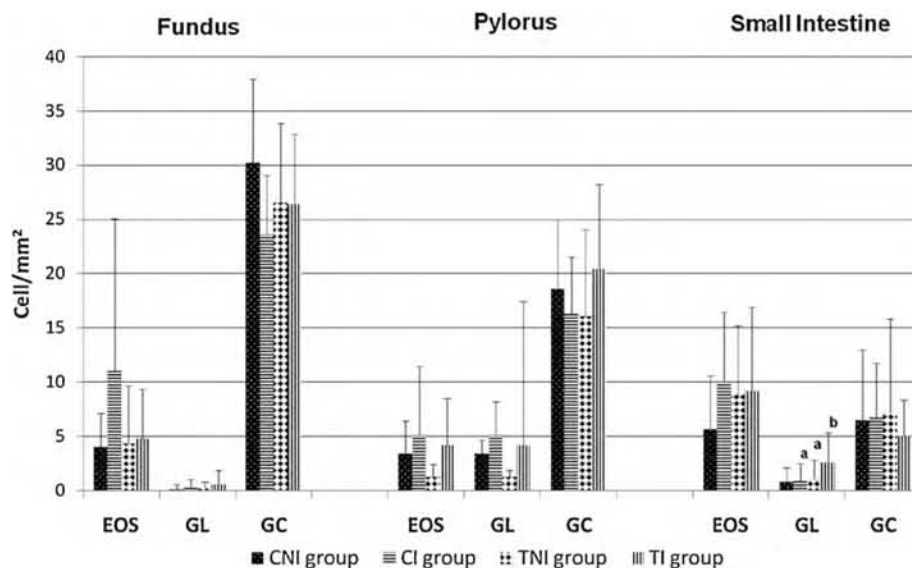


Fig. 4. Means (\pm S.D.) of eosinophils (EOS), globule leukocytes (GL) and goblet cells (GC) counts in the fundic, pyloric and small intestine mucosae in the four groups: infected with *Haemonchus contortus* and non-infected without tannins (CI and CNI groups respectively), or with *L. latisiliquum* (TI and TNI groups respectively). Values with different letters (a and b) differ at $P < 0.06$.

dations because of the presence of tannins. The present trial examined the effect of *L. latisiliquum* fodder consumption on adult *H. contortus* populations in sheep and the concomitant changes in the cellular responses in the gastrointestinal mucosae of those animals. Thus, it addressed the question of the direct vs. the indirect mode of action of a TR tropical fodder on *H. contortus*. The results of the present trial indicate five major findings:

- A short-term provision of tannin-rich fodder negatively affected the biology of the *H. contortus* population.
- The impact of the tannin-rich fodder on the worm biology was essentially a negative effect on worm size and female fecundity meanwhile the worm burdens were not affected.
- The indirect effect, through an increase in the number of mucosal inflammatory effector cells, was not evident.
- Inexperienced sheep eat sufficient quantities of the plant fodder to affect the biology of *H. contortus* worms.
- Animals infected with *H. contortus* eat more *L. latisiliquum* fodder than non-infected animals.

4.1. The negative effect of *L. latisiliquum* fodder on *H. contortus*

In the present trial, a short-term consumption of *L. latisiliquum* in sheep caused a rapid and constant decrease in faecal egg counts of the TI animals compared to those of the CI group. Such depression of nematode egg excretion has been observed in many previous *in vivo* trials in infected sheep or goats receiving different tannin-rich diets, e.g. either quebracho (Athanasidou et al., 2000, 2001; Paolini et al., 2003a,b), temperate TR legume forages like sainfoin (Paolini et al., 2003c; Heckendorn et al., 2006, 2007) or sericea lespedeza (Min et al., 2004; Shaik et al., 2004; Lange et al., 2006; Terrill et al., 2007). It has also been reported for the consumption of some *Acacia* species (Kahiya et al., 2003; Max et al., 2004, 2009). In most studies, the reduc-

tion in egg excretion was amplifying with time (Shaik et al., 2004; Lange et al., 2006; Paolini et al., 2003c) in agreement with our data.

The regression analysis showed that the relationship between female worm length and fecundity in the TI group was significantly different to that of the CI group. The latter indicated that female worms of the TI group were shorter but also contained fewer eggs according to their size as compared to worms of the CI group. A simultaneous study using scanning electron microscopy of worm specimens collected in the TI and CI animals suggested that worms of the TI group suffered limitations in their capability of feeding (ingestion), movement and/or impaired reproductive activity while such limitations were not found in the CI worms (Martínez-Ortiz-de-Montellano et al., 2009). Furthermore, the reduction in nematode egg excretion in the lambs consuming *L. latisiliquum* was not related to any significant changes in the *H. contortus* establishment or worm burden. The relationship between the growth and length of *Haemonchus* and the fertility has been previously established (Ratcliffe and Le Jambre, 1971; Oliveira-Sequeira et al., 2000). Previous studies performed in small ruminants infected experimentally or naturally with *H. contortus*, show similar overall results: significant decreases in egg excretion appeared to be mainly due to significant reductions in female fecundity without any differences in the number of worms (Paolini et al., 2003b, 2005). However, some other authors reported that the reduction in egg excretion was mainly explained by significant reductions in the number of *Haemonchus* either in sheep (Heckendorn et al., 2006, 2007; Max et al., 2004) or in goats (Kahiya et al., 2003; Shaik et al., 2004; Terrill et al., 2007). The reasons for such discrepancies in the consequences of TR food on *H. contortus* populations have not been identified yet. Differences in the experimental designs, in particular in the length of distribution of TR plants can be evoked. Evidence is accumulating to suggest that the effect of tannin-rich plants on worm population depends on the concentration

of active plant secondary metabolites, in particular of condensed tannins (Athanasiadou et al., 2001; Min et al., 2003; Hoste et al., 2006). On the other hand, differences in activity might be related to the nature of tannins. In particular, an increasing number of *in vitro* evidence has also been brought to support the hypothesis of higher AH properties associated with prodelphinidins (PDs) (one of the four classes of condensed tannins) than with procyanidins (PCs) (Molan et al., 2003; Brunet and Hoste, 2006; Brunet et al., 2008b). The ratio between PDs and PCs in *L. latisiliquum* fodder has not been measured.

One common feature of the improved host response to nematodes is an increase in the number of inflammatory cells in the mucosa: EOS, mast cells, GL and/or GC (Balic et al., 2000). However, only a few studies on the possible AH activity of TR forages has provided information on the changes in the mucosal cells in infected animals. Moreover, results of these studies were inconsistent. An increased number of EOS and mast cells has been reported in sheep infected with *T. colubriformis* (Ríos-De-Álvarez et al., 2008) fed on sainfoin. A similar trend has also been described in sheep infected with *Teladorsagia circumcincta*, fed on chicory and sulla (Tzamaloukas et al., 2006). The lack of an immunologically mediated effect in the present trial may be attributed to the short duration of the *H. contortus* infection and/or the short duration of tannin-rich fodder consumption (one week). A non-specific stimulation of mucosal cells due to tannins was not evident in the animals fed *L. latisiliquum* fodder, compared to the control animals. Previous studies by Hervás et al. (2003) showed that the consumption of quebracho as TR resource affected the digestive mucosal structures. In contrast, the changes in the mucosal inflammatory cells remained limited in goats infected with *T. colubriformis* or *H. contortus* and drenched with quebracho (Paolini et al., 2003a,b). These last results are therefore close to those obtained in the current trial since, with the exception of GL in the small intestine, the number of cells in mucosae was similar in the infected animals receiving or not *L. latisiliquum*. Similarly, another short-term feeding study with goats consuming *L. latisiliquum* fodder showed no overall changes in the mucosae (Brunet et al., 2008a).

4.2. Consumption of *L. latisiliquum* fodder in infected and non-infected sheep

In spite of the fact that sheep in the present trial had no previous experience of *L. latisiliquum* consumption, they ate sufficient quantities of TR fodder to affect the biology of the worms as reported above. An important finding was that animals infected with *H. contortus* ate more *L. latisiliquum* fodder than non-infected lambs. The latter suggests that infected animals seem to be attracted to eat more TR fodder. This has also been reported recently for *H. contortus* infected sheep supplemented with *H. albicans* (Méndez-Ortiz et al., 2009). The result suggests the ability of sheep to increase their consumption of tannin-rich plants when infected. A change in feeding behavior might be an adaptation to parasite infections has been suggested by Hoste et al. (2004). Food selection in herbivores can be interpreted as the constant quest for substances in the

external environment that provide a homeostatic benefit to the internal environment of the guts (Villalba and Provenza, 2007). Obviously, these substances can be nutrients but also plant secondary metabolites with potentially negative effect on the animal's health such as a reduction in food digestibility (Méndez-Ortiz et al., 2009). Therefore the consumption of polyphenolic compounds contained in *L. latisiliquum* fodder can be considered a potential nutraceutical tool against nematodes in sheep.

The current results confirmed that the short-term consumption of *L. latisiliquum* fodder can affect the adult worm populations in sheep and can reduce the pasture contamination with nematode eggs. The use of this plant as "cut and carry" fodder in sheep might be of interest in the design of integrated control of GIN in the tropical areas where TR plants are present, i.e. Latin America. The duration of the TR fodder consumption was very small for any possible negative effects to be demonstrated (thus, growth was not evaluated). However, if TR fodder is to be used for parasite control as nutraceutical alternative, it needs to be known whether there is a chance to affect animal performance. Further examinations under field conditions are necessary to validate this potential nutraceutical approach under mixed infection conditions using animals at browse.

Acknowledgments

This work was part of C. Martínez-Ortiz-de-Montellano co-tutelle PhD funded by CONACYT (México). The experiment was financed by CONACYT-SAGARPA-COFUPRO, México (Project No. 12440), and the Institute National Polytechnique de Toulouse, France. Special thanks to Dr. Miguel Angel Alonso-Diaz and Rodrigo Carrillo-Peraza, for their technical assistance and useful advice. We thank Dr. Mendoza-de-Gives for providing the *H. contortus* larvae.

References

- Akkari, H., Ben Salem, H., Gharbi, M., Abidi, S., Darghouth, M.A., 2007. Feeding *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage to Barbarine lambs with or without PEG: effect on the excretion of gastro-intestinal nematode eggs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147, 182–192.
- Akkari, H., Darghouth, M.A., Ben Salem, H., 2008. Preliminary investigations of the anti-nematode activity of *Acacia cyanophylla* Lindl.: excretion of gastrointestinal nematode eggs in lambs browsing *A. cyanophylla* with and without PEG or grazing native grass. *Small Rumin. Res.* 74, 78–83.
- Alonso-Diaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar-Caballero, A.J., Hoste, H., 2008a. *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* exposed to four tropical tanniferous plants. *Vet. Parasitol.* 153, 313–319.
- Alonso-Diaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Capetillo-Leal, C., Brunet, S., Hoste, H., 2008b. Effects of four tropical tanniferous plant extracts on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. *Vet. Parasitol.* 153, 187–192.
- AOAC, 1980. Official Methods of Analysis, 13th ed. AOAC, Washington, DC, USA.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2000. Consequences of long-term feeding with condensed tannins on sheep parasitised with *Trichostrongylus colubriformis*. *Int. J. Parasitol.* 30, 1025–1033.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2001. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Vet. Parasitol.* 99, 205–219.

- Athanasiadou, S., Tzamaloukas, O., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2005. Testing for direct anthelmintic effects of bioactive forages against *Trichostrongylus colubriformis* in grazing sheep. *Vet. Parasitol.* 127, 233–243.
- Balic, A., Bowles, V.M., Meeusen, E.N., 2000. The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Adv. Parasitol.* 45, 181–241.
- Brunet, S., Hoste, H., 2006. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7481–7487.
- 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., 2008a. Effect of the consumption of *Lysiloma latisiliquum* on the larval establishment of gastrointestinal nematodes in goats. *Vet. Parasitol.* 157, 81–88.
- Brunet, S., Jackson, F., Hoste, H., 2008b. Effects of sainfoin (*Onobrychis vicifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. *Int. J. Parasitol.* 38, 783–790.
- Cenci, F.B., Louvandini, H., McManus, C.M., Dell'porto, A., Costa, D.M., Araujo, S.C., Minho, A.P., Abdalla, A.L., 2007. Effects of condensed tannin from *Acacia mearnsii* on sheep infected naturally with gastrointestinal helminths. *Vet. Parasitol.* 144, 132–137.
- Cresswell, K.J., 2007. Anthelmintic effects of tropical shrub legumes in ruminant animals. PhD thesis, James Cook University, 293 pp.
- Emery, D.L., Wagland, B.M., McClure, S.J., 1993. Rejection of heterologous nematodes by sheep immunized with larval or adult *Trichostrongylus colubriformis*. *Int. J. Parasitol.* 23, 841–846.
- Flores-Guido, J.S., 2001. Leguminosae. Florística, Etnobotánica y Ecología. Leguminosae (Floristic, Ethnobotanic and Ecology). Etnoflora Yucatense, No. 18, Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México, pp. 118–121 (in Spanish with English abstract).
- GraphPad Prism 5, 2007. Prism for Windows 5.01. GraphPad Software Inc., San Diego, CA.
- Hagerman, A.E., 1992. Tannin protein interactions. In: Ho, Le, Huang (Eds.), Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health: Analysis, Occurrence and Chemistry. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 236–247.
- Hammond, J.A., Fielding, D., Bishop, S.C., 1997. Prospect for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. *Vet. Res. Commun.* 21, 213–228.
- Heckendorn, F., Häring, D.A., Maurer, V., Zinsstag, J., Langhans, W., Hertzberg, H., 2006. Effect of sainfoin (*Onobrychis vicifolia*) silage and hay on established populations of *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei* in lambs. *Vet. Parasitol.* 142, 293–300.
- 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*. *Vet. Parasitol.* 146, 123–134.
- Hernández-Orduño, G., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar-Caballero, A.J., Reyes-Ramirez, R.R., Hoste, H., Calderón-Quintal, J.A., 2008. *In vitro* anthelmintic effect of *Acacia gauderi*, *Havardia albicans* and quebracho tannin extracts on a Mexican strain of *Haemonchus contortus* L₃ larvae. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 8, 191–197.
- Hervás, G., Pérez, V., Giráldez, F.J., Mantecón, A.R., Almar, M.M., Frutos, P., 2003. Intoxication of sheep with quebracho tannin extract. *J. Comp. Pathol.* 129, 44–54.
- Hoste, H., Frantz, K., Rech, J., Morand-Fehr, P., 2004. Individual variations of egg excretions in naturally infected goats browsing in a rangeland environment. In: 8th International Conference on Goat Production, 5–9 July 2004, Pretoria, South Africa.
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., Hoskin, S.O., 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol.* 22, 253–261.
- Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., Aguilar-Caballero, A.J., 2008. Nutrition-parasite interactions in goats: is immunoregulation involved in the control of gastrointestinal nematodes? *Parasite Immunol.* 30, 79–88.
- Huntley, J.F., Patterson, M., McKellar, A., Jackson, F., Stevenson, L.M., Coop, R.P., 1995. A comparison of the mast cell and eosinophil responses of sheep and goats to gastrointestinal nematode infections. *Res. Vet. Sci.* 58, 5–10.
- Kahiya, C., Mukaratirwa, S., Thamsborg, S.M., 2003. Effects of *Acacia nilotica* and *Acacia karoo* diets on *Haemonchus contortus* infection in goats. *Vet. Parasitol.* 115, 265–274.
- Kahn, L.P., Diaz-Hernandez, A., 2000. Tannins with anthelmintic properties. In: Brooker, J.D. (Ed.), Tannins in Livestock and Human Nutrition. ACIAR Proceedings n. 92 International Workshop. Adelaide, Australia, pp. 140–149.
- Lange, K.C., Olcott, D.D., Miller, J.E., Mosjidis, J.A., Terill, 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 lamb. *Vet. Parasitol.* 141, 273–278.
- Larsen, M., Anderson, D.H., Vizard, A., Anderson, G.A., Hoste, H., 1994. Diarrhoea in Merino ewes during winter: association with trichostrongylid larvae. *Aust. Vet. J.* 71, 365–372.
- Makkar, H.P.S., 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Rumin. Res.* 49, 241–256.
- Martínez-Ortiz-de-Montellano, C., Vargas-Magaña, J.J., Aguilar-Caballero, C.A., Sandoval-Castro, C.A., Cob-Galera, L., May-Martínez, M., Miranda-Soberanis, R., Hoste, H., Cámara-Sarmiento, R., Torres-Acosta, J.F.J., 2007. Combining the effects of supplementary feeding and copper oxide needles for the control of gastrointestinal nematodes in browsing goats. *Vet. Parasitol.* 146, 66–76.
- Martínez-Ortiz-de-Montellano, C., Fourquaux, I., Brunet, S., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., 2009. Scanning electron microscopy of *Haemonchus contortus* adults after contact with extracts of two tannin rich plants: *Lysiloma latisiliquum* and *Onobrychis vicifolia*. In: World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology 2009, Abstract Volume, 8–13 August, Calgary, Canada, pp. 165–166.
- Max, R.A., Kimambo, A.E., Kassuku, A.A., Mtenga, L.A., Buttery, P.J., 2004. The effect of wattle tannin drench or an acacia meal supplement on faecal egg counts and total worm burdens of tropical sheep with an experimental nematode infection. In: Smith, T., Godfrey, S.H., Buttery, P.J., Ssewanyana, E., Owen, E. (Eds.), Small Stock in Development: Proceedings of a Workshop on Enhancing the Contribution of Small Livestock to the Livelihoods of Resource-Poor Communities. 15–19 November 2004, Hotel Brovad, Masaka, Uganda. Natural Resources International Ltd., Aylesford, UK, pp. 63–71.
- Max, R.A., Kassuku, A.A., Kimambo, A.E., Mtenga, L.A., Wakelin, D., Buttery, P.J., 2009. The effect of wattle tannin drenches on gastrointestinal nematodes of tropical sheep and goats during experimental and natural infections. *J. Agric. Sci.* 147, 211–218.
- Méndez-Ortiz, F., Sandoval-Castro, C.A., Torres-Acosta, J.F.J., 2009. Efecto del forraje de *Havardia albicans* sobre el consumo y digestibilidad de la dieta y la excreción de huevos de *Haemonchus contortus* en ovinos. In: VIII Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria, 26–28 de Octubre de 2009, Mérida, Yucatán, México, p. 232 (in Spanish).
- Min, B.R., Barry, T.N., Attwood, G.T., Mc Nabb, W.C., 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 106, 3–19.
- Min, B.R., Pomroy, W.E., Hart, S.P., Sahl, T., 2004. The effect of short-term consumption of a forage containing condensed tannins on gastrointestinal nematode parasite infections in grazing wether goats. *Small Rumin. Res.* 51, 279–283.
- Minho, A.P., Bueno, I.C.S., Louvandini, H., Jackson, F., Gennari, S.M., Abdalla, A.L., 2008. Effect of *Acacia molissima* tannin extract on the control of gastrointestinal parasites in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147, 172–181.
- Minitab, 2007. Minitab 15. Minitab Inc., State College, PA, USA.
- Molan, A.L., Meagher, L.P., Spencer, P.A., Sivakumaran, S., 2003. Effect of flavan-3-ols on *in vitro* egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. *Int. J. Parasitol.* 33, 1691–1698.
- Mueller-Harvey, I., 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 86, 2010–2037.
- Niezen, J.H., Charleston, W.A.G., Hodgson, J., Mackay, A.D., Leathwick, D.M., 1996. Controlling internal parasites in grazing ruminants without recourse to anthelmintics: approaches, experiences and prospects. *Int. J. Parasitol.* 26, 983–992.
- Oliveira-Sequeira, T.C.G., Amarante, A.F.T., Sequeira, J.L., 2000. Parasitological characteristics and tissue response in the abomasum of sheep infected with *Haemonchus* spp. *Arq. Braz. Med. Vet. Zoot.* 52, 447–452.
- Paolini, V., Frayssines, A., De La Farge, F., Dorchies, Ph., Hoste, H., 2003a. Effects of condensed tannins on established populations and on incoming larvae of *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta* in goats. *Vet. Res.* 34, 331–339.
- Paolini, V., Bergeaud, J.P., Grisez, F., Prevot, F., Dorchies, Ph., Hoste, H., 2003b. Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 113, 253–261.
- Paolini, V., Dorchies, P., Hoste, H., 2003c. Effects of sainfoin hay on gastrointestinal nematode infections in goats. *Vet. Rec.* 152, 600–601.
- Paolini, V., Prevot, F., Dorchies, P., Hoste, H., 2005. Lack of effects of quebracho and sainfoin hay on incoming third-stage larvae of *Haemonchus contortus* in goats. *Vet. J.* 170, 260–263.

- Petrie, A., Watson, P., 2006. Statistics for Veterinary and Animal Science. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Price, M.L., Van Scoyoc, S., Buttler, L.G., 1978. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.* 26, 1214.
- Ramírez-Restrepo, C.A., Barry, T.N., 2005. Alternative temperate forages containing secondary compounds for improving sustainable productivity in grazing ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 120, 179–201.
- Ratcliffe, L.H., Le Jambre, L.F., 1971. Increase of rate of egg production with growth in some intestinal nematodes of sheep and horses. *Int. J. Parasitol.* 1, 153–156.
- Raynaud, J.P., 1970. Etude de l'efficacité d'une technique de coproscopie quantitative pour le diagnostic de routine. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 45, 321–342.
- Ríos-De-Álvarez, L., Greer, A.W., Jackson, F., Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Huntley, J.F., 2008. The effect of dietary sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on local cellular responses to *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Parasitology* 135, 1117–1124.
- Shaik, S.A., Terrill, T.H., Miller, D., Kouakou, B., Kamman, G., Kallu, R.K., Mosjidis, J., 2004. Effects of feeding sericea lespedeza hay to goats infected with *Haemonchus contortus*. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 34, 234–237.
- Shelton, H.M., 2000. Tropical forage tree legumes in agroforestry systems. Internet document. FAO. www.fao.org/docrep/X3989E/x3989e06.htm.
- Terrill, T.H., Mosjidis, J., Moore, D.A., Shaik, S.A., Miller, D., Burke, J.M., Muir, J.P., Wolfe, R., 2007. Effect of pelleting on efficacy of sericea lespedeza hay as a natural dewormer in goats. *Vet. Parasitol.* 146, 117–122.
- Torres-Acosta, J.F.J., Hoste, H., 2008. Alternative or improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Rumin. Res.* 77, 159–173.
- Tzamaloukas, O., Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Huntley, J.F., Jackson, F., 2006. The effect of chicory (*Cichorium intybus*) and sulla (*Hedysarum coronarium*) on larval development and mucosal cell responses of growing lambs challenged with *Teladorsagia circumcincta*. *Parasitology* 132, 419–426.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597.
- Villalba, J.J., Provenza, F.D., 2007. Self-medication and homeostatic behavior in herbivores: learning about the benefits of nature's pharmacy. *Animal* 1, 1360–1370.
- Yacob, H.T., Durantón-Grisez, C., Prevot, F., Bergeaud, J.P., Bleuart, C., Jacquiet, Ph., Dorchie, Ph., Hoste, H., 2002. Experimental concurrent infection of sheep with *Oestrus ovis* and *Trichostrongylus colubriformis*: negative interactions between parasite populations and related changes in the cellular responses of nasal and digestive mucosae. *Vet. Parasitol.* 104, 307–317.

ARTÍCULO 2

SCANNING ELECTRON MICROSCOPY OF *HAEMONCHUS CONTORTUS* EXPOSED TO TANNIN-RICH PLANTS UNDER *IN VIVO* AND *IN VITRO* CONDITIONS

ARTÍCULO ENVIADO A LA REVISTA "PARASITOLOGY INTERNATIONAL"

Scanning electron microscopy of *Haemonchus contortus* exposed to tannin-rich plants under *in vivo* and *in vitro* conditions

Cintli Martínez-Ortíz-de-Montellano^{a,b,c}, Celia Arroyo-López^{a,b}, Isabelle Fourquaux^d, Juan Felipe de J. Torres-Acosta^c, Carlos A. Sandoval-Castro^c, Hervé Hoste^{a,b*}

^a INRA, UMR 1225, F-31076 Toulouse Cedex, France

^b Université de Toulouse; ENVT; UMR 1225; F-31076 Toulouse, France

^c Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Km. 15.5 carretera Mérida-Xmatkuil, Mérida, Yucatán; México

^d CMEAB; Faculté de Médecine de Ranguel, Université Paul Sabatier; 133 Route de Narbonne 31062 Toulouse Cedex 4, France

***Corresponding author:** Tel: +33 561193875, Fax: +33 561193243
E-mail address: h.hoste@envt.fr (H. Hoste)

Abstract

The structural changes induced in adult *Haemonchus contortus* after *in vitro* and *in vivo* contact with a tannin-rich (TR) plant, tzalam (*Lysiloma latisiliquum*) or sainfoin (*Onobrychis viciifolia*), were assessed using scanning electron microscopy (SEM). All the worms used in the study were adult females. The *Haemonchus* adult worms were obtained from the abomasum of infected donor goats. Adult *H. contortus* were kept in contact with TR plants extracts for 24 hours for the *in vitro* assays and were compared to worms maintained in PBS (control). For the *in vivo* studies, the adult *H. contortus* parasites were obtained from artificially infected donor goats. All the goats were fed a tannin-free diet until D27 post-infection when infection was patent. On D28 some goats were fed fodder of one of the TR plants for seven consecutive days. Thus, their *H. contortus* were in contact with TR fodder within the gastrointestinal tract of goats. The control worms were obtained from donor goats fed only a tannin-free diet. In the *in vitro* assays and *in vivo* studies, the SEM observations revealed structural alterations in the worms after contact with TR plants when compared to the control worms. The main changes concerned the cuticle and the buccal area. The structural changes found in the worms exposed to TR plants might affect their motility and nutrition with possible consequences on their reproduction.

Key words: Tannins; *Haemonchus contortus*; *Lysiloma latisiliquum*; *Onobrychis viciifolia*; scanning electron microscopy; structural changes.

1. Introduction

Parasitic nematodes are of major economic importance in grazing livestock because of the major production losses that they cause. Over the past few decades, the control of these parasitic diseases has mainly relied on the repeated use of anthelmintic (AH) drugs. However the efficiency of this mode of control is nowadays facing the constant diffusion of AH resistance amongst worm populations. It is thus necessary to seek alternative solutions to replace or complement the chemical drugs and to achieve a more sustainable control of parasitism [1]. One of these novel alternatives explored is the use of bioactive plants which contain secondary metabolites. In particular, antiparasitic effects have been associated with the

consumption of some tannin-rich (TR) legumes (Fabacea family). In temperate regions, the interest has focused on various legume forages like sainfoin (*Onobrychis viciifolia*), sulla (*Hedysarium coronarium*), birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) or big trefoil (*Lotus pedunculatus*) [2, 3]. In subtropical and tropical areas, some extensive studies have been dedicated to legume forages, such as sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) [4-6]. Moreover, studies have also shown some AH activity associated with a range of legume trees (Fabacea) which are browsed by small ruminants [7-10]. Several *in vivo* and *in vitro* results have illustrated the AH effects associated with these TR legumes against either the infective nematode larvae or the adult worms. A prominent role of tannins is suspected to explain these AH properties. However, the modes of action of these polyphenolic compounds against nematodes remain obscure [3, 11]. Some functional and ultrastructural changes have been recently described for the third-stage larvae [9, 12-15]. In contrast, a similar approach has not been developed for the adult worms. The objective of this study was therefore to examine the structural changes induced in the adult *Haemonchus contortus* after contact with a TR plant, tzalam (*Lysiloma latisiliquum*) or sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) under *in vitro* and *in vivo* conditions.

2. Materials and Methods

2.1 *In vitro* assays

Production of the TR extracts.

Samples of the two experimental plants were collected to obtain plant extracts. Five hundred g of fresh leaves of sainfoin (*O. viciifolia*) and tzalam (*L. latisiliquum*) each were mixed in a 70:30 mixture of acetone-water plus ascorbic acid (1g/l) for 1 h [8]. The products were filtered and the filtrates were then concentrated under low pressure. The pigments were removed by washing 4 times with dichloromethane (3 x 50 ml). The sainfoin and tzalam experimental extracts were obtained after freeze drying [7, 8].

Collection of adult Haemonchus contortus

The female adult worms used in the *in vitro* trials were collected from two naturally infected goats fed a tannin-free diet (lucerne + commercial pelleted feed *ad libitum*). The goats were

humanely slaughtered to collect the abomasums which were immediately transferred to the laboratory and opened in order to collect the female adult parasites from the abomasa using a fine brush.

In vitro exposure to TR extracts.

The worms were immediately placed into a 24-multiwell plate (one female worm per well) containing PBS (2 ml at 37°C). From this moment, all the procedures with the parasites in the multiwell plates were performed at 37°C. The worms were first kept in the wells for one hour to clean them from the abomasal contents. Thereafter, the PBS was discarded from the wells and replaced by either PBS (2ml) (control worms) (C) or tzalam extract in PBS (1200µg/ml PBS) (T) or a similar quantity of sainfoin extract in PBS (S). Four worms were used per treatment and were incubated for 24h. After the incubation period, the worms were collected and were placed in 1.5ml Eppendorf tubes with the fixative of SEM as described below.

2.2 In vivo studies

Two *in vivo* studies were performed. One study aimed at evaluating the structural changes produced by feeding the TR tropical fodder *L. latifolium* and was performed at FMVZ-UADY, Merida, Mexico. A second study examined the possible structural changes induced to *H. contortus* in animals fed with sainfoin (*O. viciifolia*). This study was performed at the Veterinary School in Toulouse, France (UMR 1225 INRA-DGER IHAP).

Tzalam study.

Fresh leaves of tzalam were harvested from the tropical forest of Merida, Mexico. This TR tree was selected on the basis of its high content of condensed tannins, and also evidence of both *in vitro* [7, 8] and *in vivo* AH effect on *H. contortus* [9, 10].

Four Criollo kids were artificially infected with 3000 L₃ of a Mexican strain of *H. contortus* (CENID-PAVET-INIFAP strain). All the animals received the same balanced tannin-free diet (30 g/kg LW). From D28 post infection, three kids were supplemented with 800g (wet basis) of tzalam fresh leaves. A single animal continued to receive the tannin-free diet. The tzalam was offered during seven consecutive days. Goats were humanely slaughtered complying with

local regulations on animal welfare. Their abomasa were removed to collect the adult worms and immediately fixed as described below.

Sainfoin experiment.

The sainfoin hay was obtained from Clermont-Ferrand, France. Two goats were experimentally infected with 5000 *H. contortus* infective larvae (INRA susceptible strain). The goats were fed until D28 after infection with gramineous hay of good quality plus a commercial concentrated feed. One goat was maintained with the tannin-free diet and used as a control animal (C). On D28, the second goat received *ad libitum* sainfoin hay instead of the gramineous hay. The goats were fed these diets for seven consecutive days. Subsequently, goats were humanely slaughtered with an overdose of sodic pentobarbital (Doletal®, France). Their abomasa were removed and rapidly processed in order to collect the adult worms which were immediately fixed as described below.

2.3 Procedure of Scanning Electron Microscopy (SEM)

The worms obtained from both the *in vitro* assays and the *in vivo* studies were fixed in a 2 % glutaraldehyde solution in a 0.1 M sodium cacodylate buffer for 4 h at 4°C. After two washes in the same buffer (0.2 M), the worms were dehydrated in a graded ethanol series, dried by critical point drying with EMSCOPE CPD 750 and coated with gold-palladium for 5 min at 100 Å min⁻¹. Parasites were then observed with a S450 scanning electron microscope (Hitachi) at an accelerating voltage of 15 kV.

3. Results

3.1 *In vitro* assays

Figure 1 shows the changes found in *H. contortus* adult worms after the *in vitro* exposure to TR extracts. The main changes observed between the control (C), the sainfoin (S) and the tzalam (T) treated *H. contortus* concerned the cuticle, the cephalic region, the vulva and the anus of the female worms. When compared to the control worm body parts which presented a smooth surface (C₁, C₂ and C₃), the parasites treated with both TR plant extracts lost their normal aspect by showing longitudinal and transversal cuticular ridges (S₁ and T₁). These

lesions were observed either on the totality of the body or by patches along the entire nematode body including the cephalic parts (S₂, T₂) and the rest of the body (S₁ and T₁), including the distal portion of the worms (not shown). Moreover, aggregates of the TR plant extracts were the most striking changes observed around the buccal capsule (B₂ and C₂) and the female vulva (C₃) or the anus (B₃).

3.2 *In vivo* studies.

Figure 2 shows the changes found in *H. contortus* adult worms after *in vivo* exposure to TR fodder for seven days. The main changes found in the *H. contortus* females collected from the sainfoin fed or tzalam fed kids, when compared to the worms obtained from the control kids, concerned the cuticle and to a lesser extent the buccal capsule. When TR plants were fed to animals, both TR plants had an effect on the cuticular structure since both transversal and longitudinal thickening/wrinkling of the cuticular ridges were observed with both the sainfoin (S₁) and the tzalam regime (T₁). In the cephalic region, some aggregates of tzalam (T₂) were observed. These were similar to those found under *in vitro* conditions. However, no obvious differences were detected between the control (C₂) and the sainfoin (S₂) nematodes. In the vulvar region, no obvious differences were observed between the worms collected from animals receiving either the control, sainfoin or tzalam diets (data not shown).

4. Discussion

The possible consequences of the consumption of fodder from a TR source on adult worm populations has been widely investigated for the last 15 years (see review by Hoste et al. [3]). In particular, the effect obtained by feeding nutraceuticals to small ruminants with either a tropical (tzalam), a subtropical (sericea lespedeza) or a temperate tannin containing legume (sainfoin) on established adult populations of *H. contortus* have been examined previously in sheep [5, 10, 16-18,] or goats [4, 6, 19-23]. The main overall effect was a significant reduction in egg excretion which reached – 80 % from the control values in some studies [5,18]. This main change has been related either to a reduction in the worm number [6,16,17,23] and / or to a reduced fertility per female worm when this parameter was measured [5, 17-20, 22].

In contrast to what exist on the third-stage infective larvae [9, 12, 13-15], less information is available on the possible mode of action of tannins and polyphenols against adult worms. Only a few *in vitro* studies aimed at examining the possible effects of TR plant extracts on the worm's functions such as motility and/or mortality, including *H. contortus* [24]. Under *in vitro* conditions, the contact with sainfoin extracts has been associated with a reduced viability of adult *H. contortus* [24]. To our knowledge the current study is the first one to explore the possible structural changes induced to adult worms, although some cuticular changes have been presented previously for *T. colubriformis* exposed to chestnut extract which is also rich in tannins [3].

The SEM changes observed *in vitro* proved the occurrence of strong interactions between the TR extracts and several worm structures. They suggest that TR extracts affect the adult *H. contortus* in many functions. However, these *in vitro* observations have been acquired with a relatively high concentration of tannin extracts (1200 µg/ml), and occurred within a short period of time, i.e. after a 24h-contact with extracts. For these reasons, the second set of studies were performed under *in vivo* conditions by feeding goats with fodder of both plants in order to verify if the changes described under the *in vitro* conditions also occurred when the artificially infected animals are fed the TR materials for a period of seven consecutive days. In these *in vivo* studies the parasites might have been exposed to lower concentrations of TR resources within the lumen of the digestive organs.

In both *in vitro* and *in vivo* conditions, the main changes reported concerned the cuticle and, to a lesser extent, the buccal capsules. On the other hand, the structural modifications of the external parts of the female reproductive systems were found *in vitro* but were not present in the *in vivo* studies.

It is worth to note that some consistencies existed between the changes produced to *H. contortus* whatever the TR legumes applied, both under *in vitro* and *in vivo* conditions. These similarities suggest that similar plant secondary metabolites (PSMs) are present in both legumes which might explain the changes. Because both sainfoin [11] and tzalam [7] contain tannins and polyphenols, these biochemical compounds appeared as the main candidates to explain the common cuticular lesions. Interestingly, these changes also correspond to those described after the contact of *T. colubriformis* with chest-nut extracts [3]. On the other hand,

when comparing the cuticular modifications induced by sainfoin and tzalam, it appears that, in both *in vitro* and *in vivo* conditions, the temperate legume created both longitudinal and transversal ridges when tzalam induced mainly a longitudinal thickening of the worm synlophe ridges. Moreover, the changes to the worm cuticle observed after contact with chestnut extracts appeared also different [3]. It can be hypothesized that the high diversity in the nature of tannins, differing between plants, can influence the interactions with the worm macromolecules, especially the proteins and glycoproteins.

The cuticle gives the shape of the worms. It is also involved in its motility and in the exchanges with the parasite environment, including the metabolic exchanges with the local environment in the digestive tract of the host [25-27]. In regard of associated functional disturbances, the structural cuticular changes which have been described in the current study might lead to possible impairments in the free movements of the nematodes (seeking for feeding sites and mating opportunities). On the other hand, it can be speculated that the presence of aggregates around the anterior part of the digestive tract (i.e. buccal capsule), which were found in both *in vitro* and *in vivo* conditions, provoked some direct disturbances in the nematode's nutrition, which might eventually lead to worm undernourishment, reduced fertility and/or mortality. The potential presence of aggregates in the cephalic part of *H. contortus* might disturb the mechanical and/or enzymatic processes which are normally involved in the consumption of blood meals by the worms. Last, the structural changes in the external reproductive organs of female worms which were clearly observed. Only under *in vitro* conditions seemed to affect the nematode reproductive function (e.g. by mechanical obstruction to egg production or expulsion). On the other hand, although the direct interaction with the reproductive tract has not been confirmed in the *in vivo* experiments, it can also be hypothesized that various reproductive processes, particularly the egg production, might also be affected by the nutritional disturbances. These observations are consistent with the significant decreases in egg excretion repeatedly reported when animals consumed a TR source [3].

These results suggest that further studies should be dedicated to achieve a better understanding of the interactions at the molecular levels between polyphenols or tannins of bioactive TR plants and the macromolecules of the nematodes.

5. Conclusion

The SEM observations revealed structural alterations in the worms after *in vitro* and *in vivo* contact with TR plants when compared to the control worms. The main changes concerned the cuticle and the buccal area. The structural modifications of the external parts of the female reproductive systems were found under *in vitro* conditions. The structural changes found in the worms exposed to TR plants might affect their motility and nutrition with possible consequences on their reproduction.

Disclosure Statement

The authors of the present paper declare that we have no actual or potential conflict of interest that could inappropriately influence the work presented.

Role of funding source

C. Martínez-Ortíz-de-Montellano wishes to acknowledge a scholarship from CONACYT, México for her PhD studies. The financial help of Institute Nationale Polytechnique de Toulouse (INPT) and the Marie Curie Program «Healthy Hay» project as well as an ECOS-Nord/CONACYT (project M03-A03) between France and Mexico is sincerely thanked.

Acknowledgements

The present study was supported by the Institute Nationale Polytechnique de Toulouse (INPT) and the Marie Curie Program «Healthy Hay» project, as well as an ECOS-Nord/CONACYT (project M03-A03) between France and Mexico.

We thank Pedro Mendoza-de-Gives (CENID-PAVET-INIFAP) for providing *Haemonchus contortus* infective larvae in Mexico. The authors would like to thank Rodrigo Carrillo-Peraza, for his technical assistance during the experiment. A special thank to Juan Pablo Hurtado-Montero for his meticulous work with the microphotographs.

References

- [1] Waller PJ, Thamsborg SM. Nematode control in „green’ ruminant production systems. *Trends Parasitol* 2004; 20:493-497.
- [2] Min BR, Hart SP. Tannins for suppression of internal parasites. *J Anim Sci* 2003; 81:102-109.
- [3] Hoste H, Jackson F, Athanasiadou S, Thamsborg SM, Hoskin SO. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol* 2006; 22:253-261.
- [4] Shaik SA, Terrill TH, Miller D, Kouakou B, Kamman G, Kallu RK, Mosjidis J. Effects of feeding sericea lespedeza hay to goats infected with *Haemonchus contortus*. *S Afr J Anim Sci* 2004; 34:234-237.
- [5] Lange KC, Olcott DD, Miller JE, Mosjidis JA, Terrill TH, Burke JM, Kearney MT. Effect of sericea lespedeza (*Lepedeza cuneata*) fed as hay, on natural and experimental *Haemonchus contortus* infections in lamb. *Vet Parasitol* 2006; 141:273-278.
- [6] Terrill TH, Mosjidis J, Moore DA, Shaik SA, Miller JE, Burke JM, Muir JP, Wolfe R. Effect of pelleting on efficacy of sericea lespedeza hay as a natural dewormer in goats. *Vet Parasitol* 2007; 146:117-122.
- [7] Alonso-Díaz MA, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Capetillo-Leal CM, Brunet S, Hoste H. Effects of four tropical tanniniferous plant extracts on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. *Vet Parasitol* 2008; 153:187-192.
- [8] 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 tanniniferous plants. *Vet Parasitol* 2008; 153:313-319.
- [9] Brunet S, Martínez-Ortiz-de-Montellano C, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Aguilar-Caballero AJ, Capetillo-Leal C, Hoste H. Effect of the consumption of *Lysiloma latisiliquum* on the larval establishment of gastrointestinal nematodes in goats. *Vet Parasitol* 2008; 157:81-88.
- [10] Martínez-Ortiz-de-Montellano C, Vargas-Magaña AJ, Canul-Ku L, Miranda-Soberanis R, Capetillo-Leal C, Sandoval-Castro CA, Hoste H, Torres-Acosta JFJ. Effect of a tropical tannin-rich plant, *Lysiloma latisiliquum* on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet Parasitol* 2010; 172:283-290.
- [11] Mueller-Harvey I. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J Sci Food Agric* 2006; 86:2010-2037.
- [12] Brunet S, Hoste H. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *J Agric Food Chem* 2006; 54:7481 -7487.
- [13] Brunet S, Aufrere J, El Babili F, Fouraste I, Hoste H. The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in the presence of a tannin-rich plant extract. *Parasitology* 2007; 135:1-10.
- [14] Brunet S, Jackson F, Hoste H. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. *Int J Parasitol* 2008; 38:783-790.

- [15] Brunet S, Fourquaux I, Hoste H. Ultrastructural changes in the infective third-stage larvae of parasitic nematodes of ruminants treated with a sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract. *Parasitol Int* 2010; submitted for publication.
- [16] Heckendorn F, Häring DA, Maurer V, Zinsstag J, Langhans W, Hertzberg H. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) silage and hay on established populations of *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei* in lambs. *Vet Parasitol* 2006; 142:293-300.
- [17] Heckendorn F, Haring DA, Maurer V, Senn M, Hertzberg H. Individual administration of three tanniferous forage plants to lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei*. *Vet Parasitol* 2007; 146:123-134.
- [18] Manolaraki F, Sotiraki S, Stefanakis A, Skampardonis V, Volanis M, Hoste H. Anthelmintic activity of some mediterranean browse plants against parasitic nematodes. *Parasitology* 2010; 137:684-696.
- [19] Paolini V, Bergaud JP, Grisez C, Prevot F, Dorchie Ph, Hoste H. Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 2003; 113:253-261.
- [20] Paolini V, Dorchie P, Hoste H. Effects of sainfoin hay on gastrointestinal nematode infections in goats. *Vet Rec* 2003; 152:600-601.
- [21] Paolini V, Prevot F, Dorchie P, Hoste H. Lack of effects of quebracho and sainfoin hay on incoming third-stage larvae of *Haemonchus contortus* in goats. *Vet J* 2005; 170 :260-263.
- [22] Paolini V, De La Farge F, Prevot F, Dorchie P, Hoste H. Effects of the repeated distribution of sainfoin hay on the resistance and the resilience of goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Vet Parasitol* 2005; 127:277-283
- [23] Terrill TH, Dykes GS, Shaik SA, Miller JE, Kouakou B, Kannan G, Burke JM, Mosjidis JA. Efficacy of sericea lespedeza hay as a natural dewormer in goats: dose titration study. *Vet Parasitol* 2009; 146:117-122.
- [24] Paolini V, Fouraste I, Hoste H. In vitro effects of three woody plant and sainfoin extracts on third-stage larvae and adult worms of three gastrointestinal nematodes. *Parasitology* 2004; 129:67-77.
- [25] Fetterer RH, Rhoads ML. Biochemistry of the nematodes cuticle: relevance to parasitic nematodes of livestock. *Vet Parasitol* 1993; 46:103-111.
- [26] Page AP. The nematode cuticle: synthesis, modification and mutants. In: Kennedy MW, Harnett W, editors. *Parasitic Nematodes: Molecular Biology, Biochemistry and Immunology*, London: CABI publishing; 2001, p. 167-193.
- [27] Page AP, Winter AD. Enzymes involved in the biogenesis of the nematode cuticle. *Adv Parasitol* 2003; 53:85-148.

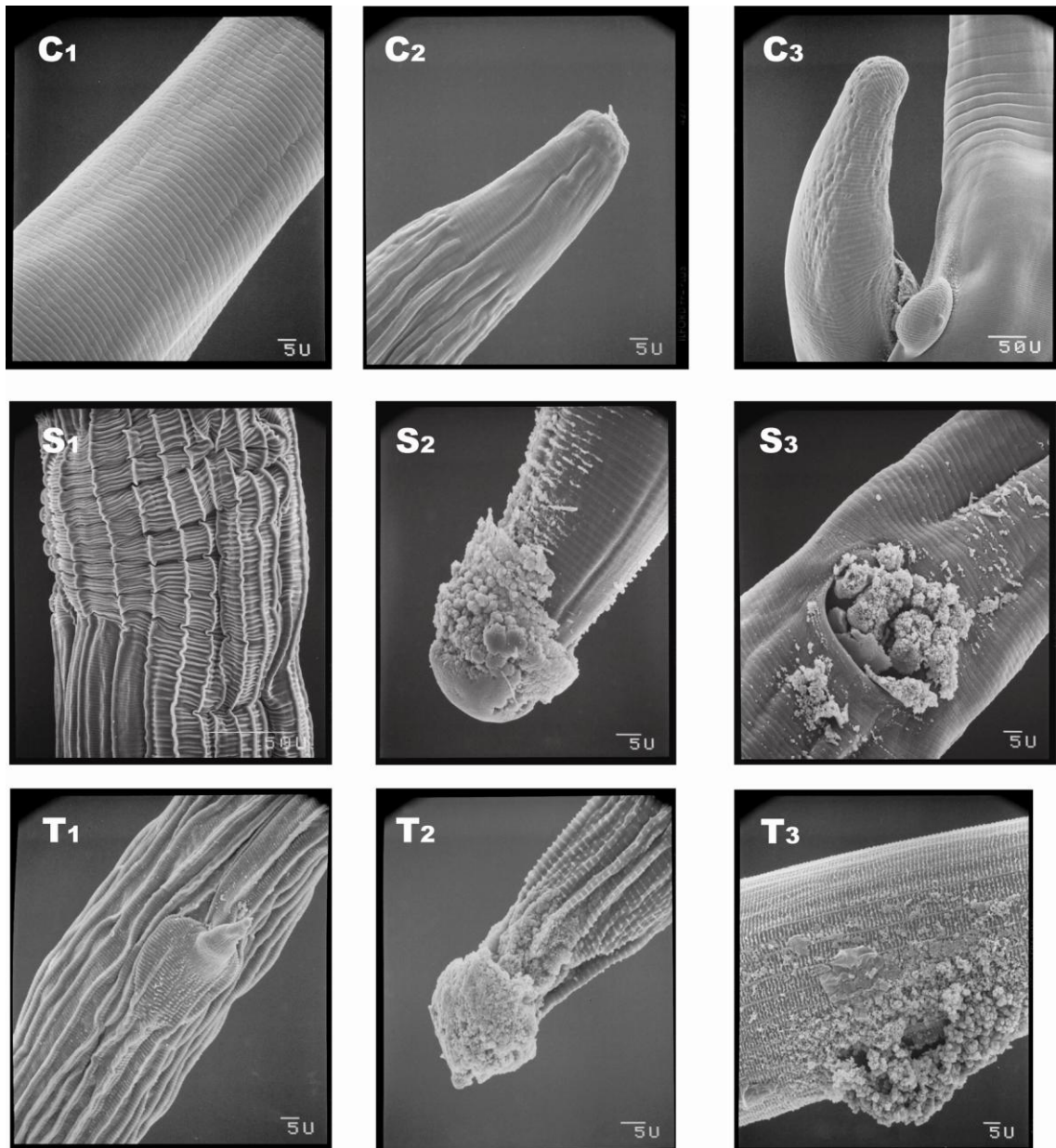


Figure 1. Comparison of the external structure of adult female *Haemonchus contortus* in contact with PBS control (C) or a tannin rich plant extract, either *Onobrychis viciifolia* (S) or *Lysiloma latisiliquum* (T), under in vitro conditions.

C1: Normal cuticle, C2: Normal cephalic region, C3: Normal vulva;

S1: Cuticular ridges with modifications, S2: Cephalic region with aggregates; S3: Anus with aggregates;

T1: Cuticular ridges with modification, T2: Cephalic region with aggregates; T3: Vulva with aggregates.

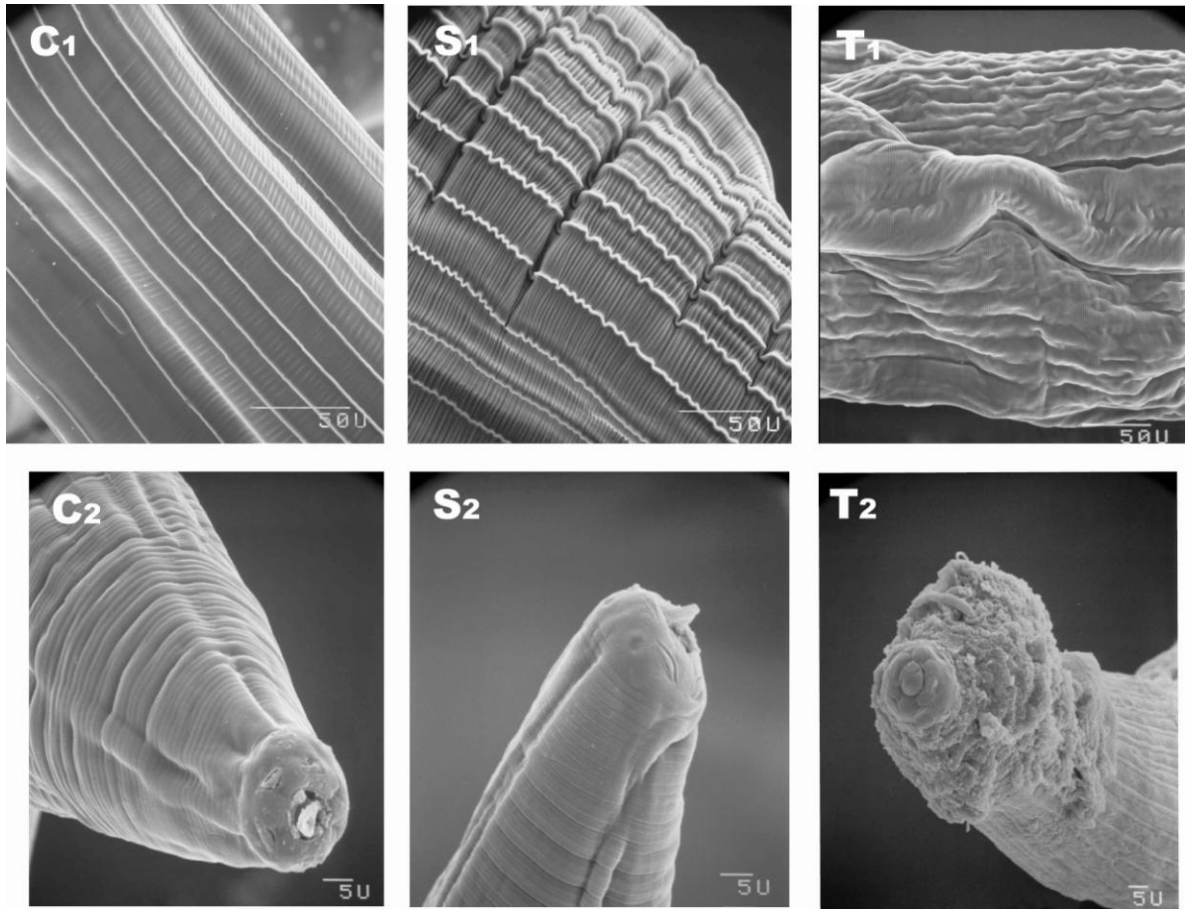


Figure 2. Comparison of the external structure of adult female *Haemonchus contortus* in contact with a tannin-free control diet (C) or a tannin rich diet containing either *Onobrychis viciifolia* (S) or *Lysiloma latisiliquum* (T) under *in vivo* conditions.

C1: Normal cuticle, C2: Normal cephalic region;

S1: Cuticular ridges with modifications, S2: Apparently normal cephalic region;

T1: Cuticular ridges with modification, T2: Cephalic region with aggregates.

ARTÍCULO 3

TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY OBSERVATIONS OF TANNIN-RICH PLANTS EFFECTS ON *HAEMONCHUS CONTORTUS*

ARTÍCULO POR ENVIAR A LA REVISTA “VETERINARY JOURNAL”

Transmission electron microscopy observations of tannin-rich plants effects on *Haemonchus contortus*

Cintli Martínez-Ortiz-de-Montellano^{a,b,c}, Isabelle Fourquaux^d, J. Leonardo Guillermo-Cordero^c, J. Felipe J. Torres-Acosta^{c*}, Carlos A. Sandoval-Castro^c, Hervé Hoste^{a,b}

^a INRA UMR 1225, F-31076 Toulouse Cedex, France.

^b Université de Toulouse; ENVT; UMR 1225; F-31076 Toulouse, France

^c Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Km. 15.5 carretera Mérida-Xmatkuil, Mérida, Yucatán, México

^d CMEAB; Faculté de Médecine de Rangueil, Université Paul Sabatier ; 133 Route de Narbonne 31062 Toulouse Cedex 4, France

***Corresponding author:** Torres-Acosta, J.F.J. Email: tacosta@uady.mx

Tel: +52 9999423200, Fax: +52 9999423205

Abstract

The objective of this trial was to assess the ultrastructural changes caused by two tannin-rich (TR) fodders (*Lysiloma latisiliquum* or *Onobrychis viciifolia*) or by quebracho extract (*Schinopsis spp*) on adult *Haemonchus contortus* to better understand the *in vivo* AH effects of tannins. Goats experimentally infected with adult *H. contortus* received the various TR resources (from D28 post infection when infection was patent) for seven days or were kept as control. They were then humanely slaughtered to take the abomasums and collect the worms, which were immediately fixed in a glutaraldehyde-cacodylate solution at 4°C. After preparation of sections, the methods of transmission electron microscopy (TEM) were used to detect possible ultrastructural changes of *H. contortus* in contact with TR plants compared to control worms. The results showed that the intestinal cells of *H. contortus* were a target for bioactive compounds of TR plants, causing acute swelling and vacuolization as well as mitochondrial damages. Similar lesions were also recorded in the muscular and hypodermal cells of treated parasites. These results suggest that the TR materials explored generated ultrastructural changes that might alter the worm motility and nutrition, resulting also eventually in possible consequences on the reproductive activity of *H. contortus*.

Key words: Transmission electron microscopy, *Haemonchus contortus*, tannin-rich plants, goats.

1. Introduction

For centuries, plants rich in secondary metabolites have been used for their medicinal properties to treat human beings or animals. Recently, the possible anthelmintic activity of TR plants has been explored as possible novel tools for the sustainable control of gastrointestinal nematodes (GINs) of ruminants in this era of anthelmintic resistance. Condensed tannins (CT) are plant secondary metabolites which are considered to be some of the active compounds explaining the anthelmintic (AH) effects against natural or experimental GIN infections (Hoste et al., 2006). Two main effects have been reported associated with the consumption of various TR resources by either sheep or goats, depending on the time of distribution in relation with the parasites' life cycle. i) When infective third stage larvae enter in a digestive environment rich in tannins, significant reductions in the parasite establishment have been reported (Paolini et al., 2003; Brunet et al., 2008a). ii) When TR fodders were consumed by ruminants infected with adult worms, the first observed effects which has been found was a reduced egg excretion. The latter has been related either to a decrease female fecundity (Paolini et al., 2005; Manolaraki et al., 2010; Martínez-Ortíz-de-Montellano et al., 2010) or reduced survival of worms (Athanasidou et al., 2009; Heckendorn et al., 2006; 2007).

Two main hypotheses, i.e direct (pharmacological like effects of the plant secondary metabolites) or indirect (immune mediated response of the host in its digestive mucosae) are usually evoked to explain these consequences on the nematode populations (Kahn and Diaz-Hernandez, 2000; Athanasidou et al., 2001; Hoste et al., 2006). Some recent studies aimed at better understanding the mode of action of condensed tannins and polyphenols on the function and structure of third stage larvae (Brunet et al., 2006; 2008b). In contrast, the precise mechanisms involved in the effects against the adult worms remain largely unknown as well as the target organs for the CT. Previous work, using scanning electron microscopy (SEM), showed alterations in the external structure of *H. contortus* such as cuticle and vulva, as well as material aggregates in the buccal capsule and the anus (Martínez-Ortíz-de-Montellano et al., unpublished data). However, no results on the effect of tannins on the ultrastructure of adult nematodes have been published so far. Although a recent study with *Acacia oxyphylla* bark extracts revealed ultrastructural changes in the tegumental interface of the cestode *Raillientina*

echinobothrida, these changes were not associated with a specific compound (Dasgupta et al., 2010).

In order to evaluate the *in vivo* efficacy of CT, it would be desirable to test its use in the target animal, both under controlled and field settings (Ketzis et al., 2006). The objective of this trial was to assess the ultrastructural changes caused by the consumption of two TR fodders (*Lysiloma latisiliquum* or *Onobrychis viciifolia*) or by drenching with quebracho extract (*Schinopsis spp*) to examine the *in vivo* AH effects of tannins on the ultra-structure of adult *H. contortus*.

2. Materials and Methods

2.1 Tropical tannin-rich plant assay

The experiment was performed at the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Yucatan FMVZ-UADY (20°52'-19°30' North, 90°00'-88°50' West) during the wet season (September-October 2008).

Fresh leaves of *Lysiloma latisiliquum* tree (Tzalam) (Leguminosae / Fabacea) were harvested from the tropical forest of Merida. Yucatan, Mexico. This tannin-rich tree was selected on the basis of its high content of condensed tannins, its biological activity and also evidence of *in vitro* (Alonso-Díaz et al., 2008) and *in vivo* AH effect on *H. contortus* (Brunet et al., 2008a; Martinez-Ortiz de Montellano et al., 2010).

Four Criollo kids were artificially infected with a Mexican *Haemonchus contortus* strain (3000 L₃) (CENID-PAVET-INIFAP strain). All the animals received the same balanced tannin free diet (30 g/kg LW). At D28 post infection (PI), three Criollo kids were supplemented with 800g of Tzalam fresh leaves. A single animal continued to receive the control diet low in tannin content. The Tzalam was offered during seven consecutive days. On day 35 PI, the kids were humanly slaughtered and their abomasa were removed to collect the worms, which were immediately fixed and processed as described below.

2.2 Temperate tannin-rich plant and commercial tannin-extract assay

A second experiment was performed at the veterinary school in Toulouse, France (UMR 1225 INRA-DGER IHAP).

Three infected adult goats artificially infected with *H. contortus* (INRA strain) were used in the study. One goat was fed with sainfoin (*Onobrychis viciifoliae*) hay *ad libitum*. One goat was drenched with an oral suspension of quebracho extract (90g/day) obtained from a commercial source. The last goat was kept as a control animal receiving a tannin-free diet (gramineous hay). The various treatments lasted for seven days. Subsequently the goats were humanly slaughtered and their abomasa removed in order to collect the adult *H. contortus* worms from each animal which were immediately fixed as described below.

2.3 Transmission electron microscopy

Adult female worms were fixed separately in 2% glutaraldehyde-sodium cacodylate buffer (pH 7.4, 0.1 M) for at least 4 h at 4 °C. The parasites were preserved at 4° C until further processing in the Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie (CMEAB) of the University Paul Sabatier, Toulouse.

The worms were washed overnight in 0.2 M sodium cacodylate buffer. Then, each *Haemonchus* was gently cut up into three sections in order to allow better penetration of the post fixative and dehydrating solutions. The anatomical section selected for the studies was the posterior end of the worms because it was thought that this will make possible to identify sections of the intestine, uterus and ovaries. The anterior end was not included in this study. The worms were then post-fixed for 1 h at room temperature with 1 % osmium tetroxide in 0.2 M sodium cacodylate buffer.

Samples were dehydrated through a series of graded ethanol solutions (30, 50 70 and 95 %, 10 min each ; 100 %, 3 x 15 min) and were then embedded in London Resin “LR White” (EMS-Euromedex, France) through successive substitution washes, consisting in dilutions of ethanol in 1/3 LRW (5h at 4°C) and 2/3 LRW (overnight at –20°C to prevent spontaneous polymerisation). This was followed by impregnation in pure LRW (30h in 3 washes at 4°C). The polymerization lasted 48 h at –20°C under UV light.

Previous to preparation of samples for TEM examination, semi thin 0.5µm sections were sliced (Ultracut Reichert Jung) and were stained with Methylene Blue Azur II. These sections were observed at a 100 x magnification with an optical microscope to get a first evaluation of the lesions in the different tissues of the worms and to further orientate the

preparation of ultra thin sections. Finally, the worms were sliced into 70-nm thick sections (Ultracut Reichert Jung) and mounted on 100-mesh collodion-coated copper grids prior to staining with 2% uranyl acetate in aqueous solution (2 min) and Reynold's lead citrate (7 min). Examinations were carried out on a Hitachi HU12A transmission electron microscope (TEM) at an accelerating voltage of 75 kV.

Results

Histological results

The semi thin sections of the *H. contortus* females exposed to the control diet are shown in Figure 1a (100x). The comparison with the *H. contortus* exposed to TR plants (tzalam or Sainfoin) or extract (Quebracho) showed at this level of observation that the intestinal epithelium and the muscle and hypodermal cells of the worms were the two main tissues consistently affected by tannin treatment. However, some differences were noticed depending on each plant. A vacuolization processes was observed in all the nematodes exposed to tannins. Although the vacuolization zones were detected in the intestinal epithelium of parasites exposed to the three plants, the lesions found in the intestine of the worms exposed to Tzalam appeared more severe and extensive than those generated by Quebracho or Sainfoin (Figure 1b, 1c and 1d respectively). On the other hand, the muscular layer underneath the cuticle appeared swollen in the worms treated by both Tzalam and Sainfoin, but far less with Quebracho. The latter also caused minor disruption of brush border (Figure 1c).

TEM results in nematodes treated with TR materials

Cuticle and muscle. Figure 2a shows the normal ultrastructure of the cuticle and muscular tissue (control worms). Ultrastructural changes were observed in the cuticle between the control nematodes and those that were exposed to different tannin rich materials (Figure 2b, 2c and 2d). The muscle tissue of *H. contortus* exposed to TR diets showed cell swelling, with the mayor changes being observed in the Tzalam treated worms. These worms also showed the formation of large irregular translucent areas (as well as swollen mitochondria with vacuoles, Figure 2b). The Quebracho treated worms showed myofibril swelling with loss of the normal

striation of myofibrils and milder vacuolization (Figure 2c). The Sainfoin treated *H. contortus* showed swelling myofibrils and electro-lucency background in the cytoplasm (Figure 2d) compared with the control fields.

Intestinal tissue. Figure 3a shows the normal ultrastructure of the intestinal tissue of *H. contortus*. The worms exposed to tannin rich fodder showed large intra-cytoplasmic translucent areas (vacuolae in most cases) (Figure 3b, 3c and 3d). Larger vacuolae and evident disruption of the endoplasmic reticulum were observed in the worms exposed to Tzalam compared to those exposed to Quebracho and Sainfoin. Also worms exposed to tannin rich sources showed swollen mitochondria (i.e. Figure 3b) and microvilli loss (not shown). Worms exposed to Quebracho and Tzalam showed swollen mitochondrias with vacuolas (not shown).

Uterus. No main interpretable differences were observed between the control and the treated worms, whatever the TR source, in the uterus and the eggs of *H. contortus*.

Discussion

To our knowledge, this is the first trial showing the lesions caused by TR sources on adult *H. contortus* aiming at a better understanding of the mechanisms of action of tannins against nematodes.

Tannins, specifically condensed-tannins, have the potential to control GIN infection (Min and Hart, 2003). The biological effects of TR plants have been demonstrated in adult *H. contortus* (Paolini et al., 2003; 2005; Heckendorn et al., 2006; 2007; Manolaraki et al., 2010; Martínez-Ortiz-de-Montellano, et al., 2010). The most frequently reported effect is a significant reduction in the parasite egg excretion of female parasites, which has been related either to a reduction in the worm number (Heckendorn et al., 2006; 2007), or a reduced fertility per female worm (Paolini et al. 2005; Manolaraki et al., 2010; Heckendorn et al., 2006; 2007; Martínez-Ortiz-de-Montellano et al., 2010).

The effect of TR plants on the structure of *H. contortus* has been studied in a previous work based on methods of Scanning Electron Microscopy (Martínez-Ortiz-de-Montellano et al., unpublished data). Results of that study provided two major findings: a) the alteration of

the cuticle (loosing its smooth surface) and b) the presence of aggregates in the cephalic part (around and in the buccal capsule). It has been hypothesized that this might disturb the process of worm nutrition, resulting in lower growth and lower fertility when compared to control worms as reported by Martínez-Ortiz-de-Montellano et al. (2010). Thus, if the cuticle of GIN is disrupted and the ingestion of food is limited, then it is possible that worms will be affected in their biology.

The study of the effect of TR materials fed to goats on the ultrastructure of *H. contortus* aims at complement the previous SEM observations. It is important to highlight that the different TR materials provoked similar ultrastructural changes but with different magnitude. Tzalam treatment seemed to cause more marked and extensive damages than Sainfoin fodder or Quebracho extract. The major consequences found were cellular lesions in the muscle and the intestinal cells of the worms which were mainly characterized by cell swelling and vacuolization of the cytoplasm. Lesions to these tissues were even observed on the semithin sections (Figures 1b,c,d). In addition vacuoles were also found in mitochondrias on TEM sections of the muscle cells and the intestine (Figure 2b, 3b). The vacuolization process might represent signs of hydropic degeneration. Vacuolization can be interpreted as the sign of a dysfunction of fluid balance between the intestine and the pseudocoelomic space (Figure 1bcd and Figure 3), or between the muscle and the pseudocoelomic space. In addition, the increase in the number and size of electro-dense bodies in the intestinal cells (Figure 3b,d) is suggestive of autophagic processes due to an overall cell disruption. To summarize, it seems that the main effects of TR plants at the parasite's cellular level, were i) mitochondrial damage, possibly leading to a decline in energy generation and ii) clear cellular fluid imbalance in different organs leading to vacuolization and acute swelling.

The pathological changes found in the intestinal cells might be due to the ingestion by the worms of tannins and polyphenols contained in the TR material fed to the host (Figure 3b,c,d). The lesions found in the cuticle and the muscle cells might result from the contact and/or passage (active or passive) of tannins through the worm's cuticle (Figure 2b,c,d). Another possible explanation might also be the consequence of the blockade of metabolite excretion due to changes in the cuticular permeability. Is known that a fluid imbalance and an acute swelling are the two major pathological processes due to a reduction of ATP production,

and when these lesion cause the irreversible damage in cells could develop a coagulative necrosis (McGavin and Zachary, 2007).

There are a particularly experiment, that reported an AH effect of a tropical TR plant (*Acacia oxyphylla*) in a helminth, but it concerned a cestode. A vacuolization process of the tegumental layers of the worm, associated with some mechanisms of action suggesting mitochondrial injuries have been described. Some muscle degradation (degeneration) was also reported. However, these authors did not determine whether such effects were the results of the action of tannins (Dasgupta et al., 2010). More studies are necessary for the tropical TR plants.

Finally, many of the damages found after contact with the TR material were similar to those reported for conventional anthelmintics. With commercial AH, some negative effects on mitochondria suggesting a decline in energy generation have been observed (Behm and Bryant., 1979; Rothwell and Sangster, 1996; Alves et al., 2005; Rao et al., 2009). A vacuolization of various organelles and cytoplasm has been recorded in *H. contortus* treated with closantel and those lesions were also attributed to fluid imbalance (Rothwell and Sangster, 1996). Autophagic processes in intestinal cells have been described in different nematodes treated with benzimidazoles (Borgers and De Nollin, 1975; Zintz and Frank, 1982). Moreover some specific damages into the different organs, for example the brush border disruption in intestinal cell or muscle degradation, had also been described using conventional anthelmintic treatments (Rothwell and Sangster, 1996; Alves et al., 2005).

Conclusions

The results demonstrate that the intestine and the muscular cells of *H. contortus* could be the main target when parasitic nematodes are exposed to a TR material. These ultrastructural changes suggested that some plant secondary metabolites might alter worm motility and nutrition, eventually affecting the reproductive activity of *H. contortus*. These results contribute to our understanding of the direct AH mechanisms of action against *H. contortus* when animals are fed TR materials. More studies are necessary, chiefly on the tannin biochemistry and its interaction with the different parasite cells. However, the present

pathological changes may provide a useful starting point in the study of the effect of non conventional AH treatments. It is important to confirm whether these lesions found in the nematodes would be reversible once the TR material is withdrawn from the host diet. In the light of some recent evidence showing differential sensibility to TR extracts in *H. contortus* larvae from different origins (Calderón-Quintal et al., 2010), it would also be important to define whether the lesions would be similar with parasite strains commonly exposed to the TR material.

Acknowledgments

C. Martínez-Ortiz-de-Montellano acknowledges receiving a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) to undergo her PhD studies. The financial help of the Institute Nationale Polytechnique de Toulouse (INPT) and the Marie Curie Program «Healthy Hay» project as well as an ECOS-Nord project between France and Mexico is sincerely thanked. The authors would like to thank Rodrigo Carrillo Peraza and Fotini Manolaraki for their technical assistance and their useful advices during the experiment. A special thank to Dr. Ian Beveridge for his knowledge and contribution given to this work and the same way to Juan Pablo Hurtado Montero for his meticulous work in microphotographs.

References

- 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 tanniniferous plant extracts on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. *Veterinary Parasitology* 153, 187-92.
- Alves, L.C., Brayner, F.A.S., Silva, L.F., Peixoto, C.A., 2005. The ultrastructure of infective larvae (L3) of *Wuchereria bancrofti* after treatment with diethylcarbamazine. *Micron* 36, 67-72.
- Athanasiadou, S., Kyriasakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2001. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep/in vitro and in vivo studies. *Veterinary Parasitology* 99, 205-219.

- Athanasiadou, S., Kyriasakis, I., Giannenas, I., Papachristou, T.G., 2009. Nutritional consequences on the outcome of parasitic challenge on small ruminants. In: Nutritional and foraging ecology of sheep and goats. *Options Méditerranéennes* 85, 29-40.
- Behm, C. A., Bryant, C., 1979. Anthelmintic action- A metabolic approach (a review). *Veterinary Parasitology* 5, 39-49.
- Borgers, M., De Nollin, S., 1975. Ultrastructural changes in *Ascaris suum* intestine after mebendazole treatment *in vivo*. *The Journal of Parasitology* 61, 110-122.
- Brunet, S., Hoste, H., 2006. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 7481-7487.
- 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., 2008a. Effect of the consumption of *Lysiloma latisiliquum* on the larval establishment of gastrointestinal nematodes in goats. *Veterinary Parasitology* 157, 81-88.
- Brunet, S.; Jackson, F.; Hoste, H. 2008b. Effects on sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. *International Journal of Parasitology*. 38:783-790.
- Calderón-Quintal, J.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Alonso-Díaz, M.A., Hoste, H., 2010. Adaptation of *Haemonchus contortus* to condensed tannins: can it be possible? *Archivos de Medicina Veterinaria*. In press.
- Dasgupta, S., Roy, B., Tandon, V., 2010. Ultrastructural alterations of the tegument of *Raillientina echinobothrida* treated with stem bark of *Acacia oxyphylla* (Leguminosae). *Journal of Ethnopharmacology* 127, 568-571.
- Heckendorn, F., Häring, D.A., Maurer, V., Zinsstag, J., Langhans, W., Hertzberg, H., 2006. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) silage and hay on established populations of *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei* in lambs. *Veterinary Parasitology* 142, 293-300.
- Heckendorn, F., Haring, 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.
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., Hoskin, S.O., 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *TRENDS in Parasitology* 22, 253-261.
- Kahn, I.P., Díaz-Hernández, A., 2000. Tannins with anthelmintic properties. *Proceedings of an International Workshop*. Australia. pp. 130-138.

- Ketzis, J.K., Vercruyse, J., Stromberg, B. E., Larsen, M., Athanasiadou, S., Houdijk, J. G.M., 2006. Evaluation of efficacy expectations for novel and non-chemical helminth control strategies in ruminants. *Veterinary Parasitology* 139, 321-335.
- Manolaraki, F., Sotiraki, S., Stefanakis, A., Skampardonis, V., Volanis, M., Hoste, H., 2010. Anthelmintic activity of some mediterranean browse plants against parasitic nematodes. *Parasitology* 137, 684-696.
- Martínez-Ortiz-de-Montellano, C., Vargas-Magaña, J.J., Canul-Ku, L., Miranda-Soberanis, R., Capetillo-Leal, C., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., 2010. Effect of a tropical tannin-rich plant, *Lysiloma latisiliquum* on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary Parasitology* 172, 283-290.
- McGavin, M. D., Zachary, J.F., 2007. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 4th Edition. Mosby Elsevier. pp. 9-22.
- Min, B.R., Hart, S.P., 2003. Tannins for suppression of internal parasites. *Journal of Animal Science* 81, 102-109.
- Paolini, V., Bergaud, J.P., Grisez, C., Prevot, F., Dorchie, Ph., Hoste, H., 2003. Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 113, 253-261.
- Paolini, V., De La Farge, Prevot, F., Dorchie, P., Hoste, H., 2005. Effects of the repeated distribution of sainfoin hay on the resistance and the resilience of goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology* 127, 277-283.
- Rao, R.U., Huang, Y., Fischer, K., Fischer, P.U., Weil, G.J., 2009. *Brugia malayi*: Effect of nitazoxanide and tizoxanide on adult worms and microfilariae of filarial nematodes. *Experimental Parasitology* 121, 38-45.
- Rothwell, J.T., Sangster, N.C., 1996. The Effects of Closantel Treatment on the Ultrastructure of *Haemonchus contortus*. *International Journal of Parasitology* 26, 49-57.
- Zintz, K., Frank, W., 1982. Ultrastructural modifications in *Heterakis spumosa* after treatment with febantel or mebendazole. *Veterinary Parasitology* 10, 47-56.

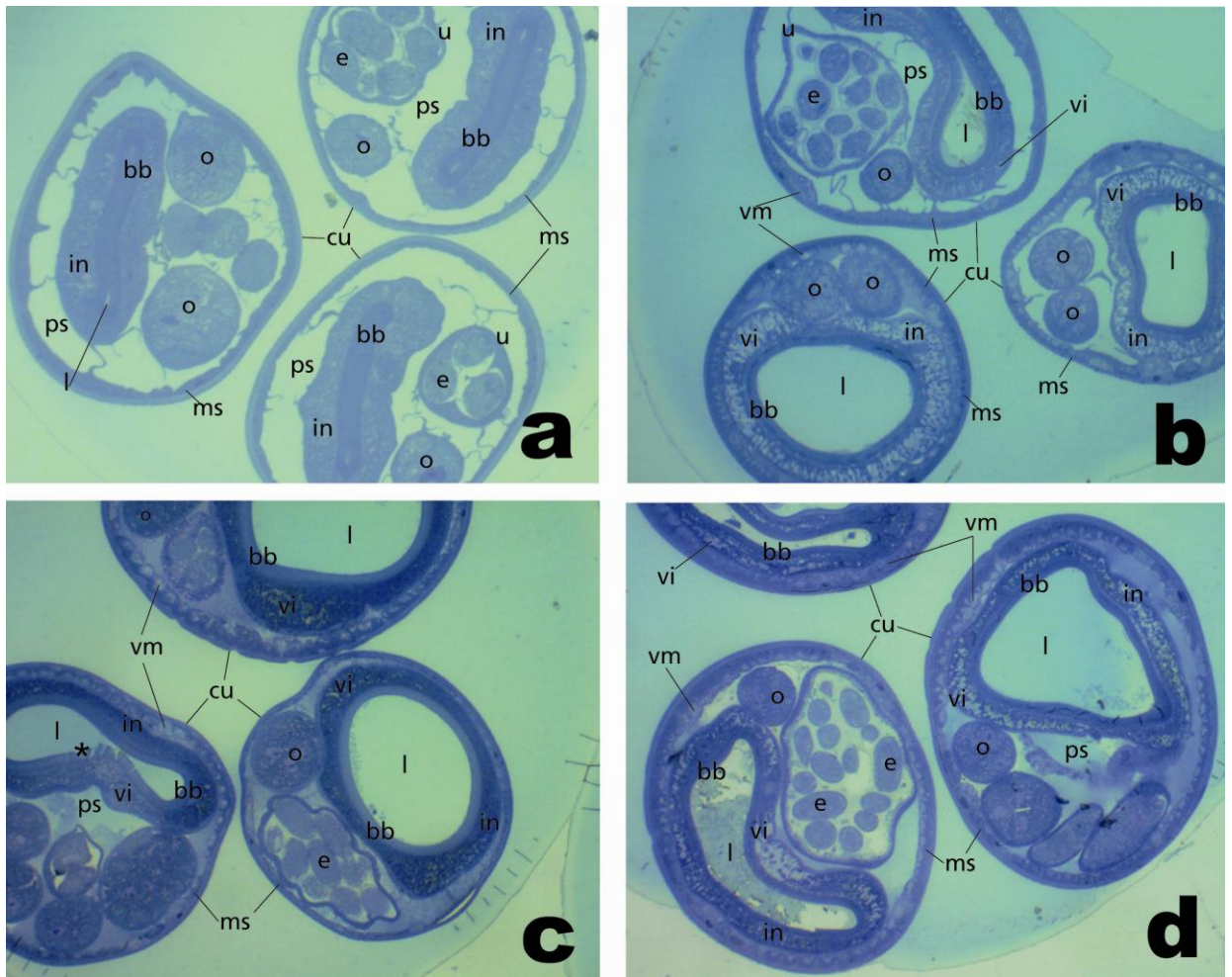


Figure 1. Differences between control worm sections (a) and Tzalam (b) Quebracho (c) and Sainfoin (d) treated parasites. **a**) Methylene blue (Azur II) stained cross-section showing the control worms 100x; cuticle (cu), muscle (ms), intestine (in), lumen of intestine (l), border brush (bb), ovary (o), uterus (u), egg sections (e) and pseudocoel (ps). **b, c, d**) Methylene blue (Azur II) stained cross-section showing the treated worms 100x; with vacuolization process in their intestine (vi) and their muscle (vm), brush border disrupted (*).

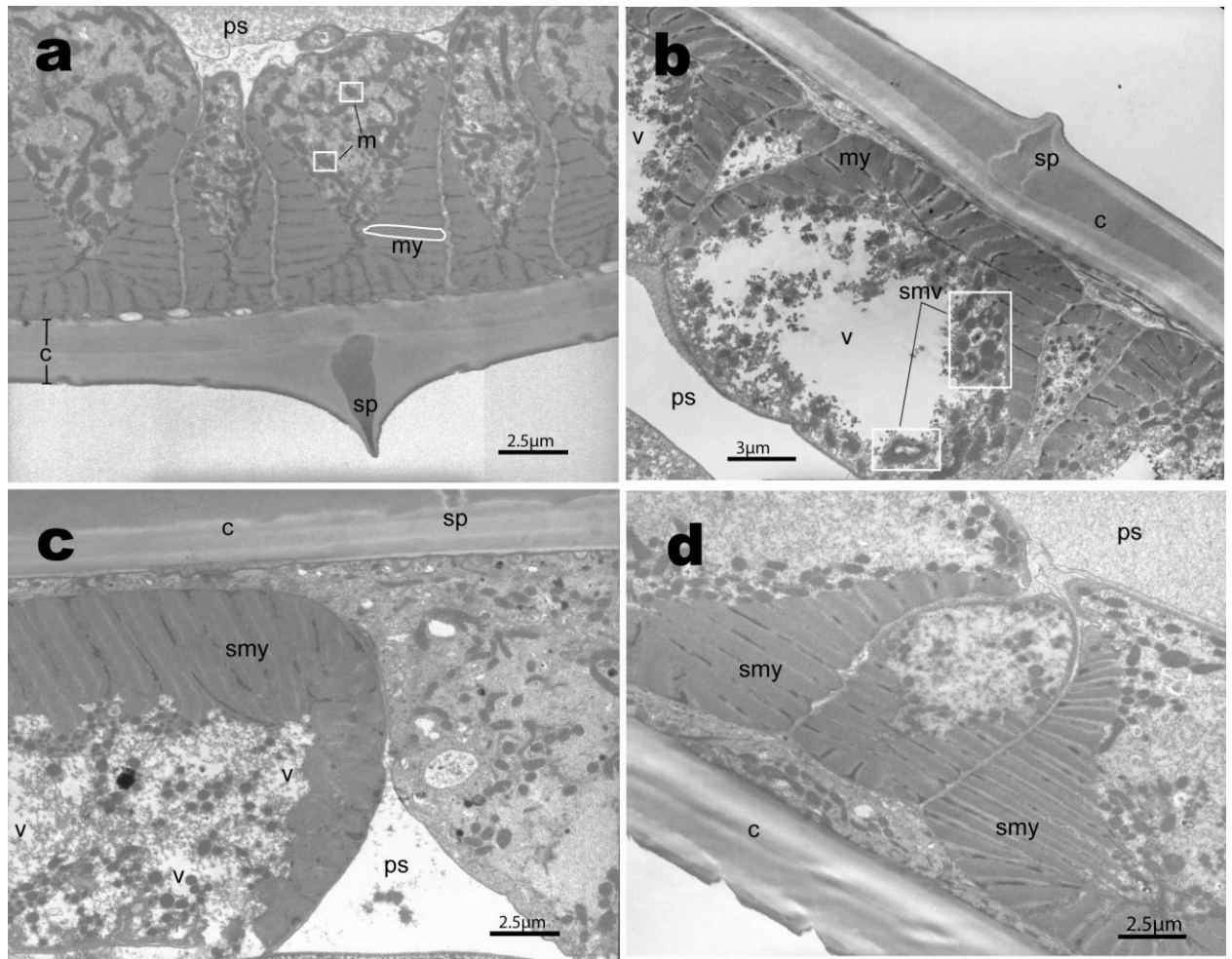


Figure 2. **a)** TEM of cuticle and muscle in control worm; longitudinal body ridge of the spine (sp), cuticle (c), myofibril (my) -marked in red-, mitochondria (m) and pseudocele (ps) in normal conditions. **b)** TEM of cuticle and muscle of a treated worm with Tzalam; spine (sp) is damaged, cuticle (c) is apparently normal, myofibrils are lightly swollen, swollen mitochondria with vacuoles in their lumen (smv), vacuole (v) in the cytoplasm of myocyte and normal pseudocele (ps). **c)** TEM of cuticle and muscle of a treated worm with Quebracho; cuticle (c) is apparently normal, swollen myofibrils (smy), vacuole (v) in the cytoplasm of myocyte and normal pseudocele (ps). **d)** TEM of cuticle and muscle of a treated worm with Sainfooin; cuticle (c) is apparently normal, swollen myofibrils (smy) and normal pseudocele (ps).

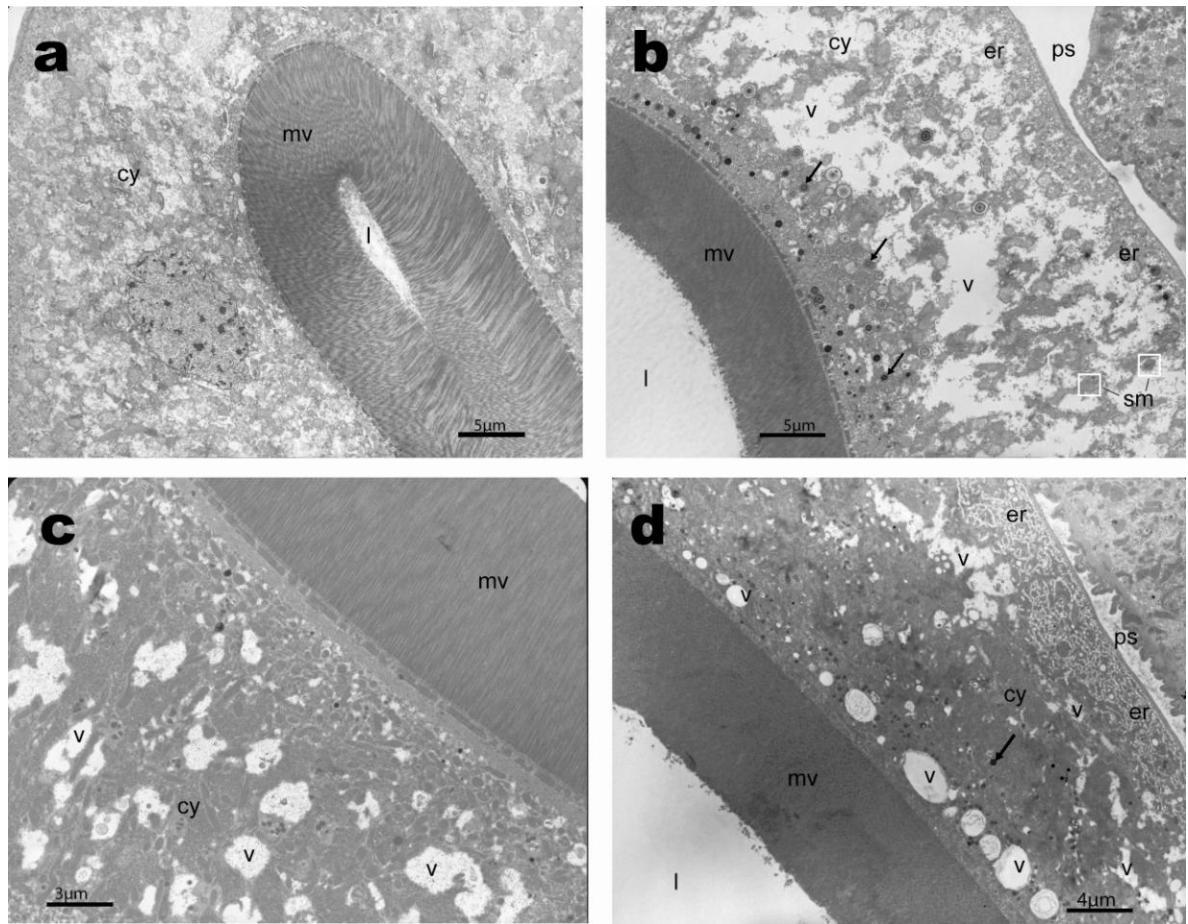


Figure 2. **a)** TEM of cuticle and muscle in control worm; longitudinal body ridge of the spine (sp), cuticle (c), myofibril (my) -marked in red-, mitochondria (m) and pseudocoel (ps) in normal conditions. **b)** TEM of cuticle and muscle of a treated worm with Tzalam; spine (sp) is damaged, cuticle (c) is apparently normal, myofibrils are lightly swollen, swollen mitochondria with vacuoles in their lumen (smv), vacuole (v) in the cytoplasm of myocyte and normal pseudocoel (ps). **c)** TEM of cuticle and muscle of a treated worm with Quebracho; cuticle (c) is apparently normal, swollen myofibrils (smy), vacuole (v) in the cytoplasm of myocyte and normal pseudocoel (ps). **d)** TEM of cuticle and muscle of a treated worm with Sainfooin; cuticle (c) is apparently normal, swollen myofibrils (smy) and normal pseudocoel (ps).

ARTÍCULO 4

SUPPLEMENTATION OF SHEEP WITH SAINFOIN HAY OR QUEBRACHO EXTRACT AFFECTS DIFFERENTLY THEIR POPULATION OF ADULT *HAEMONCHUS CONTORTUS* AND *TRICHOSTRONGYLUS COLUBRIFORMIS*.

ARTICULO POR ENVIAR A LA REVISTA "VETERINARY PARASITOLOGY"

Supplementation of sheep with sainfoin hay or quebracho extract affects differently their population of adult *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*.

Martínez-Ortíz-de-Montellano, C.^{a,b,c}, Arroyo-López C.^{a,b}, Azando, E.V.^{a,b,d}, Sandoval-Castro, C.A.^c, Torres-Acosta, J.F.J.^c, Hoste, H.^{a,b}

^a INRA UMR 1225, F 31076 Toulouse Cedex, France.

^b Université de Toulouse ; ENVT; UMR 1225; F-31076 Toulouse, France.

^c Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Km 15.5 carretera Mérida-Xmatkuil, Mérida, Yucatán, México.

^d Université d'Abomey Calavi Bénin

***Corresponding author:** Hoste, H. E-mail: h.hoste@envt.fr, Tel: +33 561193875, Fax: +33 561193243

Abstract.

This trial aimed at determining the possible direct and/or indirect anthelmintic effects of sainfoin hay and quebracho extract against adult *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* populations in sheep. Thirty two-month old Lacaune lambs were experimentally infected (D0) with 3000 L₃ larvae of *H. contortus* and 5000 L₃ larvae of *T. colubriformis*. The control group (C) received Lucerne hay (*Medicago sativa*) *ad libitum* as a tannin-free forage and a commercial concentrate feed. The quebracho (*Schinopsis spp*) group (Q) received the same diet of the control group and a quebracho oral suspension (90 g/day) from D28 PI. The sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) group (S) received the control diet plus Sainfoin hay *ad libitum*. When the infection was patent, five animals of the S and Q groups respectively were exposed to the tannin rich sources for 7 days (D28 to D34) and were sacrificed on D35 with 5 animals of the C group (short term). The remaining 5 animals in the original groups continued their treatments until D45 (16 days exposed to tannins) (long term) when the remaining animals were slaughtered. Live weight (LW) and nematode faecal egg excretion (EPG) was measured twice a week, and the PCV obtained weekly. At necropsy, abomasa and small intestine contents were recovered to determine worm burdens, female worm lengths and fecundity. Histological samples were taken from abomasums and small intestines for mucosal inflammatory cell counts. Short or long term exposure to the tannin source had no significant effect on the LW change and PCV between groups. Similarly, EPG excretion and the number inflammatory cell counts were not affected by TRP supplementation. However, *H. contortus* and *T. colubriformis* worm burdens were significantly reduced by quebracho supplementation ($P < 0.02$). The fecundity of *H. contortus* was reduced ($P < 0.4$) in the S group. The *T. colubriformis* fecundity reduced with quebracho ($P < 0.05$). Exposure time to the source of tannins had no significant effect for both GIN species.

Keywords: Tannin-rich plants, Sainfoin, Quebracho, Parasitic nematodes, Gastrointestinal tract, Sheep.

1. Introduction

Bioactive plants with anthelmintic (AH) properties are currently explored as an alternative to chemical treatments in order to reduce the dependence on commercial AH drugs, delaying the development and diffusion of AH resistance amongst populations of gastrointestinal nematodes (GIN) in small ruminants. Amongst the worldwide variety of plant secondary metabolites, saponins, sesquiterpene lactones, proteinases (Stepek et al., 2004) have been identified with AH properties (Athanasidou et al., 2009). However, in the field of veterinary parasitology the most abundant references have been obtained in small ruminants using plants which are rich in polyphenolic compounds, in particular condensed tannins (Mueller-Harvey, 2006; Hoste et al., 2006). Two non exclusive hypotheses have been proposed to explain the potential AH properties of tannins. In the direct hypothesis, it is suspected that tannins present a pharmacological-like effect by direct interaction with the parasite. On the other hand, the indirect hypothesis supposes that the effects relate to an improved host mucosal immune response because of the increased amount of peptides and amino acids reaching the small intestine due to the protective effects of tannins against ruminal protein degradations (Kahn and Diaz-Hernandez, 2000; Hoste et al., 2006).

With both quebracho and other tannin-containing legumes, the main overall effects measured on the nematode populations seem to depend on the time of consumption in relation with the life cycle, i.e. the parasitic stage submitted to the effects of PSMs. To summarize, two main effects have been reported, i.e., either a decrease in the establishment of the infective third-stage larvae; or a reduction in egg excretion when adult worms were present when a tannin-rich bioactive resource was consumed (Hoste et al., 2006). Depending on studies, this reduction in parasitic egg output has been related either to a reduced number of worms (Athanasidou et al., 2001a; Heckendorn et al., 2006; 2007), or a reduced fertility per female worms (Paolini et al 2005, Manolaraki et al., 2010). However, because of main differences in the experimental designs of studies (e.g. nature of the tannin-containing resources used, length of distribution, parasite species, host species, etc.), it is difficult to analyze the origin of these differences in effects. Scharenberg et al. (2008), emphasized the need to prove the long-term conditions for improve the action of TR plants. In this context there is evidence suggesting that the long time exposure to tannins could cause detrimental effects of polyphenols (Muller-

Harvey, 2006). Consequently, the short term exposure may offer a way of minimizing the negative effects of these metabolites for the host. Nevertheless, Athanasiadou et al. (2009), mentioned that the short term penalties on animal performance could lead to long term benefits. These long term benefits could impact the parasite epidemiology through lower parasite egg excretion, lower exposure to infection and greater protection from parasites.

The aim of the present study was to verifying the role of either the direct or indirect effects of tannins and TR plants on sheep parasitic nematodes. First, the direct effect was determined by measuring an indicator of the biology of GIN (FEC, worm burden (total worms and per species) and the worms' fecundities (eggs *in utero*). Second, the indirect effect was studied as the concomitant changes in the cellular responses in the gastrointestinal mucosae. Both objectives were explored in short (7 days) and long term (17 days) tannin provision.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental design

Thirty naïve (non-infected) three-month-old Lacaune lambs were experimentally infected (D0) with 3000 third-stage larvae (L₃) of *Haemonchus contortus* and 5000 L₃ of *Trichostrongylus colubriformis*. The larvae were obtained from donor goats experimentally infected with a pure strain of each nematode species. In a first period (from D0 to D28), all lambs were offered a high quality gramineous hay and pelleted food.

On D28 post infection (PI), the lambs were subdivided into three experimental groups which were balanced according to sex, bodyweight and the level of egg excretion. The experimental groups were as follows:

- Ten lambs composed a control group (C), which remained on the same diet as previously.
- Ten lambs composed the Quebracho group (Q). They were fed on the same diet as the Control group but received also daily, an oral drench of 90 g of Quebracho extract. The latter was diluted first in 150 ml of water at 60 °C. It was given to the lambs three times per day. It was calculated that this represented 6% of the DM of the diet.
- Ten lambs composed the Sainfoin group (S), which, received Sainfoin hay (*Onobrychis viciifolia*) daily *ad libitum* (from D28). Hay was provided instead of the initial gramineous

hay. At the start of Sainfoin consumption (D28), the amount of Sainfoin hay consumed represented 5 % of the DM of the diet.

Care was taken to make the diet isoenergetic and isoproteic between the 3 experimental groups, by adjusting the level of concentrate feed inclusion.

To evaluate the possible role of the length of consumption of the tannin-containing resource, the three experimental groups were subdivided (n = five lambs) in short term subgroups (SS, QS, CS) receiving the respective diets for 8 days, and long term subgroups (SL, QL, CL) receiving their diets for 17 days. Lambs of the short- term subgroups were humanely slaughtered on D36 PI. Lambs of the long term subgroups were slaughtered on D45 PI. The lambs selected for the first slaughtering were chosen in each group according to the lowest PCV values.

2.2 Plant analyses

On samples of sainfoin and gramineous hay plus quebracho extracts, the total phenol (TP) and total tannin (TT) contents were determined using the Folin-Ciocalteau assay (Makkar, 2003). The condensed tannin (CT) contents were measured using the Vanillin assay (Price et al., 1978).

2.3 Pathophysiological measurements

Blood samples were taken early in the morning every week from D-6 (before infection) to D42 PI to measure the Packed Cell Volume (PCV). The PCV values were measured according to a microhaematocrit method (Hansen and Perry, 1994). In addition, the live weight (LW) of the lambs was determined on the same days of blood sampling starting on D0.

2.4 Parasitological measurements

From D18 PI onwards, individual faecal samples were taken twice per week, and faecal egg counts (FEC) were performed according to a modified McMaster technique (Raynaud, 1970). In addition, pooled faeces of lambs from the three groups were cultured separately for 10 days at 22 °C and the larvae were collected by the Baermann method in order to determine the

species composition. Fifty infective larvae (L₃) harvested from each culture were identified according to the keys described in MAFF (1986).

The lambs were humanely slaughtered (D36 or D45 PI) complying with the local regulations of animal welfare. Immediately after death, the abomasums and small intestines were removed, separated and processed by washings to collect the worms from the contents. Moreover, for the abomasal mucosae, a pepsin digestion was applied to collect the abomasal larvae present in the mucosae. The numbers of worms were counted in the abomasal, the intestinal contents and the digested abomasal tissue based on a 10% aliquot method as reported by Martinez-Ortiz-de-Montellano et al. (2007). The rates of *H. contortus* and *T. colubriformis* establishment were calculated as the total number of worms recovered at necropsy divided by the total number of L₃ given, multiplied by 100. The sex of each worm was recorded and the male/female sex ratio was calculated. In addition, the fertility of the female worms was estimated according to two diverging techniques. For *H. contortus*, twenty individual adult female worms were placed in respective Eppendorf tubes. Each one was grounded separately with a rod to release the eggs from the uterus. Thereafter, the tube was filled with 1 ml of water and the total number of eggs was determined under the microscope based on a 10% aliquot technique. For *T. colubriformis*, twenty adult female worms were then placed on a microscope slide and the number of eggs was counted directly in utero at a 100x magnification under a microscope.

2.5 Histological analyses

At necropsy, histological samples were collected from the fundus, the pylorus and the small intestine at 2 m from the stomach junction to determine the number of mast cells, globule leukocytes and eosinophils in the different mucosae according to the technique described by Larsen et al. (1994). The histological samples were fixed either in 10 % buffered formaldehyde solution or with the Carnoy's solution. The mast cells were counted after staining with Alcian blue-safranin on the Carnoy's fixed samples. On the other hand, the tissues fixed in formaldehyde were stained with hematoxylin-eosin to count globule leukocytes and eosinophils. The stained cells were enumerated at a 400 magnification using a calibrated graticule encompassing an area of 0.25mm². Mean cell densities per tissue and per

cellular types were obtained from the mean counts on 10 fields, randomly selected. The results are expressed as the mean number of cells per mm² of mucosae.

2.6 Statistical analyses

The data from the FEC were log transformed (FEC+1) before being analyzed. For the FEC, and the PCV measurements, the statistical comparisons were performed first with repeated measures variance analyses using the data collected from D28 to D45 PI, taking into account two factors the treatment and the time.

For the data collected after necropsy, the mean worm counts (*H. contortus* or *T. colubriformis*) were (\log_{n+1}) transformed. The transformed worm counts, total and per parasite species, as well as the respective female worm fecundities (eggs *in utero*) per species were compared using respective two-factor ANOVA test (the treatment and the length of distribution of the tannin-containing resource). *Post-hoc* comparisons were then performed using the Bonferroni test. Similarly, the mean values of the different mucosal cell counts (EOS, GL and MC) were compared using similar two-way analysis of variance with *post-hoc* Bonferroni comparisons. All statistical analyses were performed using the SYSTAT 9.0 software.

3. Results

3.1 Plant analyses

The polyphenol content (g/100g) of the Sainfoin sample was TP: 1.08, TT: 0.26 and CT: 0.22. The polyphenol content (g/100g) of the Quebracho sample was TP: 8.82, TT: 4.96 and CT: 7.07.

3.2 Pathophysiological measurements

PCV values. Before the experimental period, no significant differences were observed between the three experimental groups of lambs for the PCV values. After the distribution of experimental diets (D28), the repeated measurements analysis of variance showed no significant differences for PCV between experimental groups either due to treatment or length of tannin source distribution.

Live weight. On D6, the mean LW of the lambs was 15 ± 2.86 kg. The mean LW of lambs in the short term groups (CS, SS, QS) was 21 ± 2.44 kg on D35. The mean LW of lambs in the long term groups (CL, SL, QL) was 26 ± 4.95 kg at slaughter (D42). No significant differences were observed in the mean LW between the experimental groups during the trial.

3.3 Parasitological measurements

Fecal egg counts. The mean FEC of the different groups is shown in Table 1. The repeated measurements analysis of variance did not show any significant differences between groups (Figure 1).

Infective larvae from cultures. The larvae harvested from the faecal cultures of the different groups showed that the majority of eggs in the faeces were *H. contortus* (from 85 to 96 % of the identified larvae) the rest were *T. colubriformis* larvae.

Worm burden. A significant statistical difference ($P < 0.01$) was found in the total worm burdens (*H. contortus* plus *T. colubriformis*) depending on the tannin source used (Table 1). A lower total number of worms was found in the Quebracho groups compared to the S and C groups. On the other hand, the effect of the length of distribution (short vs long term groups) was not significant. The separate analyses per nematode species confirmed these results. According to the treatment factor, the worm number was significantly lower for both *H. contortus* and *T. colubriformis* in lambs receiving the Quebracho extracts (Table 1). No significant difference was found between the short or long term exposure to a tannin-rich resource for *H. contortus* and *T. colubriformis* when analyzed individually.

Worm fecundity. Significant statistical differences were found for fertility of both *H. contortus* and *T. colubriformis* between treatment groups. In contrast, no significant differences were found depending on the length of distribution of the TR resources. For *H. contortus*, the fertility was lower in the S group compared to the Q and C groups. For *T. colubriformis* lower values were found in the Q group when compared to the C group (Table 1).

3.4 Cellular response

Whatever the anatomical location, no significant differences were found between the three experimental groups for the mast cell numbers. For eosinophils, significant differences were

found only in the pylorus ($P < 0.02$) with higher values in the S group compared to the Q and C groups (Table 2). The most consistent statistical differences were found for the mucosal GL numbers. No significant differences were found between the three types of diet in the number of GL in the pylorus. However, significant differences according to the treatment were found for the fundic ($P < 0.01$) and the intestinal ($P < 0.01$) GL values. Lower values in the C group compared to the S and particularly the Q group (Table 2).

Discussion

The direct effect of TRP against the adult GIN populations has been poorly investigated. Most research on the effects of TRP against GIN explored the effects on different larval stages of different GIN that affect small ruminants. The objective of the present trial was to determine the possible existence of direct and indirect AH effects of two different sources of tannins against adult populations of *H. contortus* and *T. colubriformis*. Although the AH effect was evident when feeding sheep with both sources of tannins, it was evident that many factors seem to be affecting the effect of the different materials on the different worms species. A clear reduction in the worm burdens of *H. contortus* and *T. colubriformis* was observed in the sheep supplemented with quebracho extract (QS and QL). Similar results have been reported in sheep (Athanasiadou, et al., 2000ab) and goats (Paolini et al., 2003). In contrast, Max et al. (2005) reported a reduction of abomasal worms but not of the intestinal species in sheep. In the present trial quebracho also caused a reduction of the *T. colubriformis* female fecundity but not in *H. contortus*. Supplementation with sainfoin did not affect worm burdens and only caused a reduction of the *H. contortus* female fecundity. The reduction in fecundity due to sainfoin supplementation has been reported before by Paolini et al. (2005) in *H. contortus* and *T. colubriformis*. Thus, the present trial is the second reports of reduced female worm fecundity caused by sainfoin supplementation in small ruminants. Other researchers reported also a reduction in the parasite load in abomasal parasites of goats (Paolini et al., 2003) and sheep (Heckendorn et al., 2006). The AH effect found with sainfoin supplementation was not affected by time of exposure to tannins. It is important to emphasize that, in the case of sainfoin, there are very few trials investigating the impact of sainfoin supplementation on the biology of parasitic worms of different species. It is possible that most researchers prefer to

work with quebracho extract as an easier approach rather than using fodder with the inherent difficulties of tannin content variability, palatability, selectivity, etc.

The results of the present trial suggest that the mode of action of both tannin rich sources could differ. The latter may suggest that the AH effect is affected by various factors (Athanasidou et al., 2007). Firstly, an inherent difference due to worm species can be addressed and how these worm species are affected by the different plant material. In other words, it seems that a certain plant affects more one of the parasite species than the other. In principle, this could be related to the components contained in the different plants as reported by Athanasidou et al. (2007). On the other hand, the differences can be attributed to many other features: a) the different structural and physiological properties/features of the nematode species (Athanasidou et al., 2007), b) the type food that the parasite use within the host (blood, quimo, etc.) (Linklater and Smith, 1993; Hansen and Perry, 1994;), and c) the chemical characteristics of the nematode's cuticle (Fetterer and Rhoads, 1993; Page, 2001). Two recent studies evaluated the AH effects (structural and ultrastructural damage) of different sources of tannin rich materials under *in vitro* and *in vivo* conditions (Martinez-Ortiz-de-Montellano et al., submitted for publication). Those trials showed differences between the parasite species *H. contortus* and *T. colubriformis* when exposed to sainfoin and *Lysiloma latisiliquum*. Apparently the intestinal worms were affected in larger extensions of the body than the abomasal worms.

The expected AH effects were not as evident as in previous trials with these same tannin rich materials. In the present trial, quebracho extract was a commercial good quality product. However, dosage of quebracho was not adjusted for the growth of the experimental sheep. It is possible that an adjustment according to LW could have resulted in more efficacy in the AH effect. In the case of sainfoin, the quantity of total polyphenols, total tannins and condensed tannins was low (see above). It is possible that the sainfoin strain used normally has a low polyphenol concentration or from a geographic region where sainfoin do not produce large quantities of polyphenols (Manolaraki et al., submitted for publication). Thus, the present trial highlights the importance of including in the methodology the plant analyses including the plant bioactivity (Alonso-Díaz et al., 2010a) which was not addressed in the present study.

An important factor that has not yet been determined is the mode of action of tannins (Hoste et al., 2010; Alonso-Díaz et al., 2010ab). In the present trial, two sources of tannins (quebracho and sainfoin) showed different results against the same GIN specie. The *H. contortus* and *T. colubriformis* worm burdens were reduced with quebracho. The quebracho also reduced *T. colubriformis* fecundity. Meanwhile, sainfoin only affected *H. contortus* female fecundity and did not cause any evident effect on *T. colubriformis*. In spite of the evidence of a negative impact of both tannin sources on the worms, the FEC of the sheep supplemented with tannins was not different to that of the control sheep. This is rather unexpected and shows the importance of more accurate ways of measuring FEC including total faecal egg counts for instance.

The cellular response of the hosts only showed a mild change when supplemented with tannin rich materials. However, globule leucocytes increase was more evident in those animals exposed to worms for longer time, including the control animals. Thus, the present experimental design failed to prove any long term effect of tannins on inflammatory response of lambs. It could be necessary to test longer periods of tannin supplementation compared to controls to accept or discard any possible effect of tannins on immune response.

Conclusions.

The results of the present study showed the direct AH effect of tannin rich supplements against adult *H. contortus* and *T. colubriformis*. The quebracho supplementation affected *H. contortus* and *T. colubriformis* worm burdens as well as *T. colubriformis* female fecundity. The sainfoin only affected the *H. contortus* fecundity. The length of the supplementation did not affect any of the results. There is no evidence of the indirect effect caused by tannins in the present trial.

Acknowledgments

C. Martínez-Ortíz de Montellano wishes to acknowledge a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) to undergo her PhD studies. The financial help

of the Marie Curie Program «Healthy Hay» project as well as of an ECOS-Nord project between France and Mexico is sincerely thanked. Special thanks to Fotini Manolaraki, Mne. Celine and Mme. Isabelle Pardo for their technical assistance and their useful advices during the experiment.

7. REFERENCES

Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Capetillo-Leal, C., 2010a. Polyphenolic compounds of nutraceutical trees and the variability of their biological activity measured by two methods. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 12, 649-656.

Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., 2010b. Tannins in tropical tree fodders to small ruminants: A friendly foe? *Small Rumin. Res.* 89,164-173.

Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2001a. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Vet. Parasitol.* 99, 205-219.

Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F. Coop, R.L., 2001b. The effects of condensed tannins supplementation of foods with different protein content on parasitism, food intake and performance of sheep infected with *Trichostrongylus colubriformis*. *Br. J. Nutr.* 86, 697-706.

Athanasiadou, S., Githiori, J., Kyriazakis, I., 2007. Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction. *Anim.* 1, 1392-1400.

Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Giannenas, I., Papachristou, T.G., 2009. Nutritional consequences on the outcome of parasitic challenges on small ruminants. *Options Méditerranéennes.* 85, 29-40.

Fetterer, R.H., Rhoads, M.L., 1993. Biochemistry of the nematodes cuticle: relevance to parasitic nematodes of livestock. *Vet. Parasitol.* 46, 103-111.

Hagerman, A.E., 1992. Tannin protein interactions. In: Ho, Le and Huang (Eds.), *Phenolic compounds in food and their effects on health: Analysis, occurrence and chemistry*, American chemical society, Washington DC, pp. 236-247.

Hansen, J., Perry, B., 1994. *The Epidemiology, Diagnosis and Control of Helminth Parasites of Ruminants*. ILRAD, Nairobi, pp. 17–25, 66–83, 131–132.

Heckendorn, F., Häring, D.A., Maurer, V., Zinsstag, J., Langhans, W., Hertzberg, H., 2006. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) silage and hay on established populations of *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei* in lambs. *Vet. Parasitol.* 142, 293-300.

Heckendorn, F., Haring, 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*. *Vet. Parasitol.* 146, 123-134.

Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., Hoskin, S.O., 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol.* 22, 253-261.

Hoste, H., Manolaraki, F., Brunet, S., Martínez-Ortíz-de-Montellano, C., Ojeda-Robertos, N.F., Torres-Acosta, J.F.J., 2010. Direct and indirect effects of bioactive legume forages against parasitic infections: Experiences with tropical and temperate forages. *Vet. Parasitol.* Accepted.

Kahn, L.P., Diaz-Hernandez, A., 2000. Tannins with anthelmintic properties. In: Brooker, J.D. (Ed.), *Tannins in livestock and Human Nutrition*. ACIAR Proceedings n. 92 International workshop, Adelaide, Australia, pp. 140-149.

- Larsen, M., Anderson, D.H., Vizard, A., Anderson, G.A., Hoste, H., 1994. Diarrhoea in Merino ewes during winter: association with trichostrongylid larvae. *Aust. Vet. J.* 71, 365-372.
- Linklater, K., Smith, M.C., 1993. Diseases and disorders of the sheep and goat. Mosby-Wolfe. London, UK. pp. 45-46.
- MAFF (MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD). 1986. Helminthology. In: *Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques*, Reference Book 418, 3rd edn. Her Majesty's stationery office, London. UK.
- Makkar, H.P.S., 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Rumin. Res.* 49, 241-256.
- Manolaraki, F., Sotiraki, S., Stefanakis, A., Skampardonis, V., Volanis, M., Hoste, H., 2010. Anthelmintic activity of some mediterranean browse plants against parasitic nematodes. *Parasitology.* 137, 684-696.
- Martínez-Ortiz-de-Montellano, C., Vargas-Magaña, J.J, Aguilar-Caballero, C.A., Sandoval-Castro, C.A., Cob-Galera, L., May-Martínez, M., Miranda-Soberanis, R., Hoste, H., Cámara-Sarmiento, R., Torres-Acosta, J.F.J., 2007. Combining the effects of supplementary feeding and copper oxide needles for the control of gastrointestinal nematodes in browsing goats. *Vet. Parasitol.* 146, 66-76.
- Max, R.A., Wakelin, D., Dawson, J.M., Kimambo, A.E., Kassuku, A.A., Mtenga, A., Craigon, J., Buttery, P.J., 2005. Effect of quebracho tannin on faecal egg counts and worm burdens of temperate sheep with challenge nematode infections. *J. Agric. Sci.* 143,519-527

Mueller-Harvey, I., 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 86, 2010-2037.

Page AP., 2001. The nematode cuticle: synthesis, modification and mutants. In: Kennedy MW, Harnett W, editors. *Parasitic Nematodes: Molecular Biology, Biochemistry and Immunology*, London: CABI publishing. pp. 167-193.

Paolini, V., Dorchies, P., Hoste, H., 2003. Effects of sainfoin hay on gastrointestinal nematode infections in goats. *Vet. Rec.* 152, 600-601.

Paolini, V., De La Farge., Prevot, F., Dorchies, P., Hoste, H., 2005. Effects of the repeated distribution of sainfoin hay on the resistance and the resilience of goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.* 127, 277-283

Price, M.L., Van Scoyoc, S., Buttler, L.G., 1978. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.* 26, 1214.

Raynaud, J.P., 1970. Etude de l'efficacité d'une technique de coproscopie quantitative pour le diagnostic de routine. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 45, 321-342.

Scharenberg, A., Heckendorn, F., Arrigo, Y., Hertsberg, H., Gutzwiller, A., Hess, H.D., Kreuzer, M., Dohme, F., 2008. Nitrogen and mineral balance of lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and fed tanniferous sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) *J. Anim. Sci.* 0, 2007-0048.

Stepek, G., Behnke, J.M., Buttle, D.J., Duce, I.R., 2004. Natural plant cysteine proteinases as anthelmintics? *Trends Parasitol.* 20, 322-327.

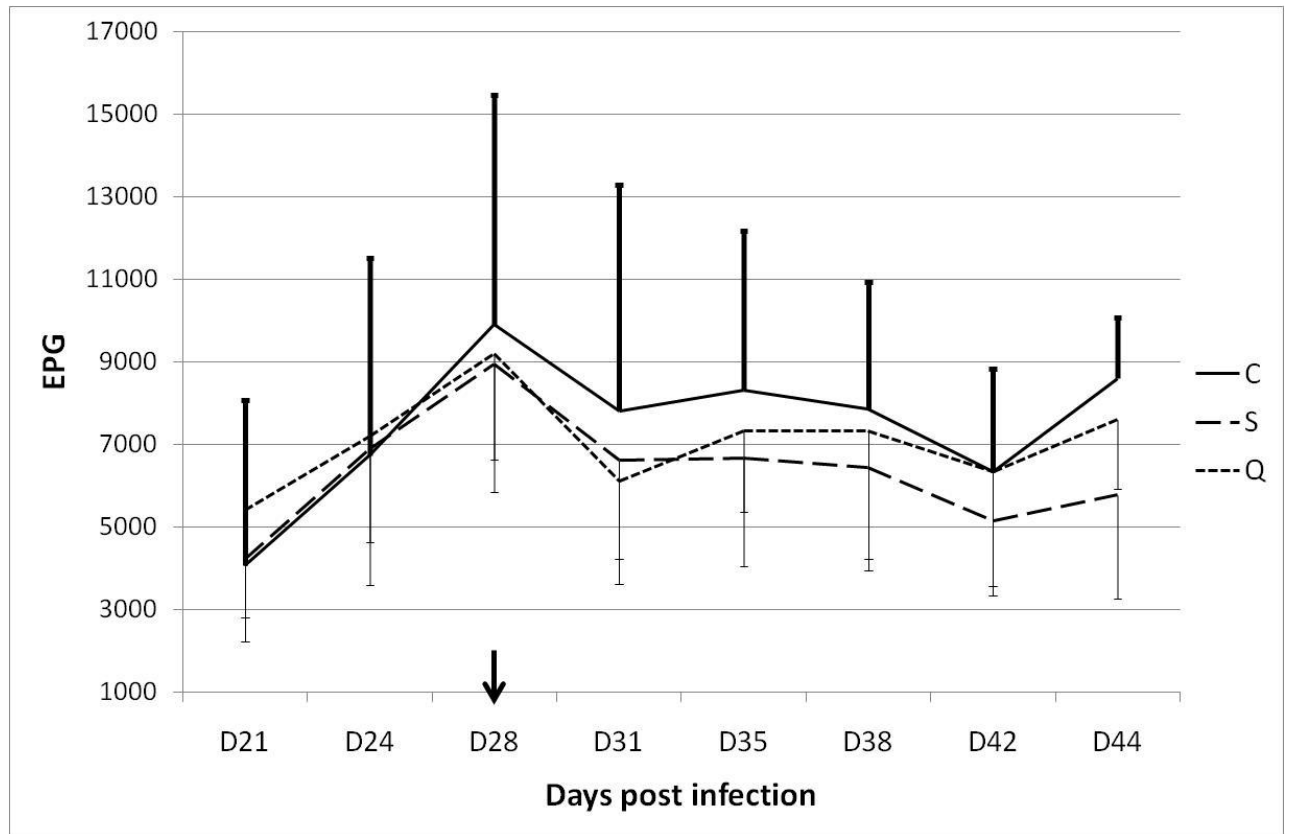


Figure 1. Arithmetic mean of faecal egg counts (eggs per gram) in lambs fed *Onobrychis viciifolia* (S), lambs treated with quebracho extracts (Q) and control group (tannin free diet, C). The black arrow represents the date when the distribution of *O. viciifolia* and quebracho started in the treated groups.

Table 1. Arithmetic means (\pm S.D.) of the back transformed FEC, mean worm counts (total and by worm species), female worm fecundities of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* from sheep fed with a tannin free diet (CS and CL), fed Sainfoin tannin rich hay (SS and SL) or treated with Quebracho tannin extract (QS and QL).

Groups	FEC	Mean worm numbers			Fecundities (eggs in utero)	
		Total worm number	<i>Haemonchus contortus</i>	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	<i>H. contortus</i>	<i>T. colubriformis</i>
Control short term CS						
Mean (\pm S.D.)	9262 (\pm 6170.72)	4318 (\pm 1002.41)a	1424 (\pm 269.69)a	2894 (\pm 772.77)a	513.9 (\pm 232.22)b	26.6 (\pm 5.26)b
Control long term CL						
Mean (\pm S.D.)	6275 (\pm 2571.02)	3618 (\pm 679.25)a	1212(\pm 522.42)a	2406 (\pm 841.56)a	619.7 (\pm 336.21)b	27.31 (\pm 4.89)b
Sainfoin short term SS						
Mean (\pm S.D.)	7668 (\pm 2576.90)	5508 (\pm 577.94)ab	1472 (\pm 154.98)ab	4036 (\pm 961.73)ab	347.2 (\pm 225.63)a	24.29 (\pm 5.22)ab
Sainfoin long term SL						
Mean (\pm S.D.)	5709 (\pm 2333.97)	4490 (\pm 294.01)ab	1326(\pm 295.54)ab	3018 (\pm 484.69)ab	317.5 (\pm 176.85)a	25.23 (\pm 4.19)ab
Quebracho short term QS						
Mean (\pm S.D.)	7664 (\pm 2905.04)	3506 (\pm 722.07)ac	1156 (\pm 542.15)ac	2350 (\pm 1364.83)ac	581.2 (\pm 306.58)b	24.66 (\pm 4.84)a
Quebracho long term QL						
Mean (\pm S.D.)	6688.75 (\pm 2883.83)	2560 (\pm 933.90)ac	774 (\pm 258.9)ac	1786 (\pm 1412.63)ac	802.0 (\pm 295.31)b	23.95 (\pm 4.51)a

Tabla 2. Eosinophyle, globule leucocytes and mastocytes counts of the fundus, pylore and intestine in the different animal groups.

Organ	Cell	CS	CL	SS	SL	QS	QL
Fundus	EOS	11.62 (+7.62)	12.88 (+9.40)	12.32 (+5.83)	8.60 (+4.29)	15.71 (+5.98)	14.23 (+9.56)
	GL	11.02 (+5.49)a	19.73 (+7.18)a	9.77 (+4.54)a	11.52 (+5.28)a	15.84 (+6.16)b	15.95 (+6.42)b
	MAS	2.27 (+2.10)	2.68 (+2.18)	2.88 (+2.03)	3.45 (+1.68)	2.57 (+2.03)	2.43 (+1.99)
Pylore	EOS	5.57 (+3.42)a	7.25 (+4.13)a	11.00 (+5.50)b	9.90 (+5.62)b	8.02 (+5.30)a	7.95 (+4.71)a
	GL	12.10 (+19.9)	13.02 (+6.47)	6.90 (+3.92)	11.50 (+5.71)	9.95 (+4.83)	8.00 (+3.71)
	MAS	4.83 (+3.44)a	6.47 (+4.56)a	5.38 (3.58)a	6.25 (+4.02)a	4.67 (+3.68)a	5.28 (+3.41)a
Intestine	EOS	24.45 (+9.70)	24.50 (+9.12)	35.02 (+17.11)	29.62 (+13.80)	31.29 (+12.65)	24.80 (+14.21)
	GL	3.05 (+2.36)a	5.15 (+3.79)a	9.77 (+2.45)b	11.52 (+4.69)b	12.20 (+5.06)b	17.17 (+8.31)c
	MAS	5.72 (+3.29)	7.02 (+4.91)	5.45 (+3.74)	5.45 (+3.13)	4.88 (+3.04)	5.70 (+4.60)

7. DISCUSION GENERAL

7.1 PRT como antihelmíntico para pequeños rumiantes

Existen numerosos reportes acerca de la eficacia de las plantas ricas en taninos (PRT) como antihelmínticos (AH) en contra de los nemátodos gastrointestinales (NGI) de pequeños rumiantes, tanto en plantas de clima templado (Hoste et al., 2006) como de clima tropical (Alonso-Díaz et al., 2010a). Sin embargo, los resultados obtenidos a la fecha han sido variables y ninguno aún establece el mecanismo de acción de los taninos sobre los NGI (Athanasiadou et al., 2007). En el presente trabajo se identificaron cinco grandes rubros, que abarcan diferentes factores que intervienen en la acción antihelmíntica de las PRT y se cree son necesarios para llegar a conocer el mecanismo de acción de los taninos:

- I. El empleo de las PRT locales
- II. El empleo de los extractos de las PRT
- III. Las PRT como nutracéutico
- IV. El consumo voluntario de las PRT
- V. La evidencia del efecto AH de las PRT

El empleo de las PRT locales

Las PRT empleadas en el presente trabajo, son plantas endémicas de las regiones en dónde se realizaron los experimentos. Considerar la interacción de la planta endémica con los parásitos de cepas locales, es visualizar el ecosistema natural bajo las condiciones normales en las que se desarrollan ambos para poder interactuar. Esto puede ser resultado de un mecanismo de equilibrio en dicho ecosistema. Y un estudio más profundo de esta interacción nos permitiría tal vez conocer los mecanismos de acción de los taninos sobre los NGI. Además, esto también facilita la difusión de los resultados de aquellas plantas que muestren resultados positivos, proporcionando más detalles del mecanismo de acción de las PRT contra los NGI en las producciones de pequeños rumiantes de una misma región.

El empleo de extracto de PRT

Existen fuentes comerciales de extractos de PRT como el quebracho (*Schinopsis spp*). La potencial industrialización y comercialización de los taninos provenientes de PRT,

puede resultar en una fuente alterna de polifenoles para los productores (Alonso-Díaz et al., 2010a). Los extractos comerciales no están certificados para su uso como AH. Se necesitan más estudios y pruebas con diferentes PRT para evaluar la factibilidad de utilizar procesos de extracción taninos para su uso como AH. Hasta ahora se han encontrado fuertes variaciones en la actividad AH de los extractos de PRT, lo cual es posiblemente debido a variaciones en la metodología utilizada para su preparación (Athanasiadou et al., 2007), a la naturaleza del extracto, e incluso a la fuerte variación en el contenido de taninos de las PRT cosechadas en la misma época e incluso en zonas cercanas (Alonso-Díaz et al., 2010b). Estos factores pueden influir seriamente en el modo o mecanismo de acción dadas las características químicas del tanino. Además, una vez que se tiene un extracto, sus características físicas no siempre favorecen cualquier forma de utilización (observación realizada durante el experimento del Artículo 4). Evidentemente esto implica que el uso de extractos todavía no es viable técnicamente.

Las PRT como nutraceutico

Si se toman en cuenta los resultados positivos que respaldan el efecto AH del forraje de PRT, así como su elevado contenido de nutrientes (principalmente proteína) es posible considerar el uso de éstas, como nutraceuticos, o sea, recursos que proveen metabolitos secundarios benéficos para la salud, mientras que, de manera simultánea contribuyen a la nutrición del animal que las consume, como lo han establecido ya diferentes autores (Hoste et al., 2006; Rochfort et al., 2008; Athanasiadou et al., 2009). Sin embargo, se corre el riesgo de que la planta seleccionada no precisamente tenga efecto nutraceutico, por lo que antes de recomendar alguna estrategia que incluya el uso de PRT habría que apoyarse en investigación que corrobore que los forrajes seleccionados tengan tanto efecto AH como una buena composición química desde el punto de vista nutricional para la especie animal a la que se quiere tratar, por ejemplo a ovinos y/o caprinos. Con éste enfoque, el mecanismo de acción de los taninos contenidos en las plantas en contra de las parasitosis, tal vez implique, una serie de eventos que desencadenen un efecto directo sobre el parásito y un efecto indirecto, mejorando la capacidad del hospedero a responder ante dicha parasitosis. Estos efectos que serán profundizados más adelante.

El consumo voluntario de las PRT

Un aspecto a favor de la PRT estudiadas en el presente trabajo es que, a pesar de un posible efecto de astringencia o un impacto negativo sobre la digestibilidad de la dieta, debido a sus altos niveles de taninos contenidos en ellas, las PRT fueron consumidas por los animales en cantidades suficientes para observar efectos AH *in vivo* (Artículo 1). Además, el consumo de éstas PRT, no originaron problemas aparentes de salud o trastornos digestivos según los resultados ya publicados (Alonso- Díaz et al., 2008; 2009; Brunet et al., 2008; Martínez-Ortíz-de-Montellano et al., 2010). Sin embargo, la astringencia de otras PRT si puede evitar su consumo (Jean-Blain, 1998; Bennick, 2002), resultando en una ausencia del efecto AH deseado. Es necesario continuar con los estudios sobre aspectos relacionados con la aceptación y consumo de las PRT para poder establecer estrategias adecuadas de suplementación que permitan el efecto AH deseado.

El mecanismo de acción de las PRT sobre los NGI, puede comenzar desde el consumo selectivo que el hospedero realiza sobre dichas plantas. Este trabajo evidencia (Artículo 1) la teoría de la automedicación de los rumiantes propuesta por Villalba y Provenza (2007). Los ovinos infectados consumieron mayores cantidades de PRT en comparación con aquellos no infectados (Martínez-Ortíz de Montellano et al., 2010). Aún cuando resultados similares han sido reportados con otra PRT de la región (Méndez-Ortiz et al., 2009) esta conducta de automedicación requiere ser validada con estudios específicamente diseñados para probar esta hipótesis.

La evidencia del efecto AH de las PRT

El efecto AH de las PRT ha sido reportado para dos de las especies de NGI más importantes a nivel mundial *H. contortus* y *T. colubriformis* (Hoste et al., 2006; Alonso-Díaz et al., 2010a). Se ha sugerido que en infecciones mixtas los forrajes de PRT o los extractos ricos en taninos pueden afectar a una sola especie (Max et al., 2004; Paolini et al., 2005; Cenci et al., 2007; Max et al., 2009). Una hipótesis que arroja el presente trabajo es, la posible existencia de la variación del efecto AH sobre las diversas especies de NGI debido a su diferente localización en el tracto gastrointestinal con las diferencias en el microambiente del lumen. Recientemente se comprobó que tanto *H. contortus* como *T.*

colubriformis son afectados por los taninos de PRT consumidos por caprinos (Brunet et al., 2008). También se señala, acerca de la existencia de diferentes mecanismos de acción que pudieran estar asociados a la biología y/o fisiología de cada parásito. En este trabajo, se obtuvo evidencia de que los NGI *H. contortus* parecen tener menor cantidad de material de agregación en la cutícula (Artículo 2) que los *T. colubriformis* (trabajo no incluido en la tesis). Probablemente la diferencia del pH alcalino en el intestino permita que los taninos se unan más fácilmente a la cutícula de *T. colubriformis*. Es necesario profundizar más en el conocimiento de estos fenómenos.

Recientemente se ha reportado sobre las diferencias en la susceptibilidad en distintas cepas *H. contortus* a los taninos de extractos de PRT. Los parásitos fueron obtenidos en tres áreas geográficas diferentes. La primera se obtuvo de la región donde la PRT evaluada representa una parte importante de la dieta de los rumiantes y ésta es la que presenta menor sensibilidad al efecto AH del extracto (Calderón-Quintal et al., 2010). Las otras dos cepas, de zonas geográficas donde este material no está en la dieta de los rumiantes mostraron mayor sensibilidad al extracto evaluado. Esto ha llevado a hipotetizar sobre el desarrollo de “resistencia” a los taninos por parte los NGI, sobre todo en aquellos parásitos que han estado en contacto continuo con estos metabolitos secundarios (Calderón-Quintal et al., 2010) o a cuestionarnos cual es el mecanismo de acción de estos componentes.

Para considerar una acción AH por parte de las PRT es también importante considerar que existe una variación importante en el contenido de taninos en las diferentes partes de las plantas por ejemplo las hojas y las cortezas. Aún dentro de una misma especie las cantidades de taninos pueden variar significativamente en las mismas fracciones (Jean-Blain, 1998, Alonso-Díaz et al., 2010b), lo cual puede afectar la actividad AH esperada. El proporcionar las plantas o dosis de extractos ricos en taninos a los animales infectados puede ser relativamente sencillo, como se detalla en los experimentos de los Artículos 1 y 4, sin embargo es necesario garantizar cierta uniformidad en el tipo de forraje, la parte de la planta suministrada y la calidad. No hay que olvidar que como cualquier medicamento, la dosis a emplear de extracto o la cantidad de PRT a consumir, deberán ser ajustados de acuerdo a la especie, el peso y la edad de los animales. Estos criterios no siempre son

empleados, o reportados, posiblemente puede explicar la ausencia de algunos efectos AH esperados en algunos reportes.

Los factores que anteriormente fueron discutidos nos permiten tener un panorama previo al consumo de una planta o un extracto rico en taninos por parte de un pequeño rumiante, los resultados obtenidos en los experimentos realizados en este trabajo así como las observaciones halladas fueron piezas fundamentales para poder desarrollar una propuesta del mecanismo de acción de las PRT sobre la población adulta de los NGI, que en el siguiente apartado se discutirá. .

7.2 ¿Cómo funcionan las PRT sobre los nemátodos adultos de *Haemonchus contortus*?

Abordar la interacción entre las PRT y las poblaciones de NGI en los pequeños rumiantes significa investigar y analizar procesos bioquímicos y biológicos muy poco estudiados. Ambos tipos de procesos son importantes para entender los mecanismos de acción de los taninos en contra de los parásitos. En el desarrollo de este trabajo no fue posible evaluar de manera bioquímica de esta interacción. Sin embargo, la evidencia obtenida en los diversos experimentos permite proponer un esquema del mecanismo de acción de las PRT contra los NGI adultos, específicamente *H. contortus* (Figura 11). En esta figura se plantean las diferentes rutas y ambientes que pudiera tener el tanino para desarrollar un efecto ya sea directo o indirecto.

Cuando un ovino o caprino ingiere material vegetal rico en taninos, durante el proceso de masticación las vacuolas en las hojas se rompen y se liberan los taninos condensados (TC). Los TC se van a asociar a proteínas salivales, como las proteínas ricas en prolina o histatinas (Alonso-Díaz et al., 2010b). También pueden asociarse a componentes de la dieta como la proteína vegetal, polisacáridos, metales y proteínas de la pared celular (Ramos et al., 1998; Muller-Harvey, 2006), y finalmente hay una parte que no se adhiere y quedan en forma de TC libres (Ramos et al., 1998). Los taninos ligados a proteína rica en prolina o histatina forman complejos fuertes y débiles, respectivamente (Wróblewski et al., 2002). Así en complejo o libres viajan por el tracto gastrointestinal hasta llegar al abomaso donde estos complejos pueden ser liberados por el ambiente ácido del abomaso (pH 2.5) (Zimmer y Cordesse, 1996; Ramos et al., 1998; Butter et al., 1999;

McSweeney et al., 2001; McSweeney et al., 2008; Waghorn, 2008). Posteriormente podrán ser liberados nuevamente en el intestino, mismo que tiene un pH alcalino (8-9) (Ramos et al., 1998; Butter et al., 1999). Mientras tanto, los taninos libres pueden ser absorbidos o degradados a su paso por el sistema digestivo (Pérez-Maldonado y Norton, 1996). Los taninos que se adhieren a las paredes celulares y los que se adhieren a la lignina son generalmente excretados en las heces (Pérez-Maldonado y Norton, 1996). Los que están unidos a la proteína vegetal pueden ser hidrolizados en el abomaso y absorbidos (Waghorn et al., 1994ab; Reed, 1995; Ramos et al., 1998; Barry y McNabb, 1999; Hoste et al., 2006). Una vez que se ha descrito la ruta de los TC a través del organismo del hospedero de los NGI, se describe el posible mecanismo de acción directo e indirecto de las PRT.

EFECTO DIRECTO

Si se contextualiza a *H. contortus* como un parásito que habita en el abomaso y en éste se cuenta con la presencia de contenido vegetal rico en taninos en complejo o disociados, surgen tres hipótesis sobre el mecanismo de acción de las PRT: 1) los taninos son ingeridos por los NGI; 2) los taninos penetran en la superficie de los NGI; 3) los taninos tienen una acción oxidativa que afecta a los parásitos.

Ingestión de los taninos por los NGI

Cuando hay material rico en taninos llegando al abomaso es probable que *H. contortus* ingiera taninos debido a que el contenido del abomaso del hospedero se encuentra saturado de los mismos. La evidencia de esta ingestión pudiera ser el acúmulo de material (llamado en los Artículos con el término de agregado) que satura la cápsula bucal de los parásitos y otras partes de la cutícula, tal como fue observado en la microscopía electrónica de barrido (ver Figura 1 S₂, T₂ y Figura 2 T₂ del Artículo 2). Los acúmulos de material en la superficie del nemátodo, que también fueron observados en *T. colubriformis* (evidencia no incluida en la tesis) son probablemente complejos tanino-proteína aunque esto debe ser dilucidado todavía. La evidente presencia de estos acúmulos en la cápsula bucal de *H. contortus* puede ser explicado por la presencia de un microambiente en el espacio de la cápsula bucal con un pH capaz de permitir la unión de los taninos (liberados con el pH

ácido del abomaso) con las proteínas localizadas en la región bucal. Por consiguiente, al alimentarse los nemátodos consumen este material. Una vez que los taninos son ingeridos por el nemátodo, sea como complejos (unidos a metales, proteínas, hemoglobinas, etc.) o libres. Estos pasan a través del organismo del nemátodo hasta llegar a su intestino, que como se sabe representa un 80% de su estructura anatómica (Lee, 2002). En las diferentes partes del intestino del nemátodo, el pH es muy variable y el rango va desde un pH 3 hasta un pH 10, por lo tanto quizás este complejo tanino-proteína es nuevamente disociado cuando se encuentra en regiones del intestino con los rangos de pH adecuado para ello. Así, los taninos libres serían absorbidos (Terril et al., 1994; Pérez-Maldonado y Norton, 1996) por las microvellosidades y bombeados dentro del intestino. Posiblemente, una vez dentro de la célula intestinal, la primera acción de los taninos es una disminución del ATP como inicio de un daño celular observado en las Figuras 1 y 2 del Artículo 3, provocando dos principales procesos patológicos:

1) Inflamación y vacuolización: Estas lesiones están presentes en los tejidos musculares e intestinales de los parásitos sometidos a las PRT tanto *in vitro* como *in vivo* (Figuras 1, 2 y 3 del Artículo 3). El proceso de inflamación, que puede ir seguido de un proceso de vacuolización en el citoplasma, se debe a la disfunción de los mecanismos que garantizan el balance de fluidos (McGavin y Zachary, 2007). Afectando la bomba de Na^+ y K^+ , incrementando el Na^+ intracelular, causando así un incremento de H_2O .

2) Degeneración hídrica de baja amplitud. Causa una producción de ácido láctico y un decremento en el pH. Esto arroja una serie de cambios patológicos como, lesiones en membrana, condensación de la cromatina, lesiones mitocondriales como inflamación de las mitocondrias (como se observa en las Figuras 2b y 3b del Artículo 3), pérdida de los ribosomas, crestas dilatadas y proceso de vacuolización dentro de las mitocondrias (ver Figura 2b del Artículo y 3) alteraciones del retículo endoplásmico con la pérdida de los ribosomas (no mostrado). Todas estas lesiones son sugestivas a una necrosis coagulativa en el nemátodo. Lesiones similares fueron encontradas en células de órganos como el sistema reproductivo (no mostrado) y en el músculo (Figura 2 del Artículo 3).

Además de las lesiones celulares ya mencionadas y las alteraciones del balance de fluidos, es importante recordar que el pseudocele es el esqueleto del parásito (Lee, 2002) y

si esté sufre una alteración o estrés osmótico, todo el organismo (NGI) esta en riesgo de morir (Rothwell y Sangster, 1996). Ambos procesos patológicos pueden ser interpretados como un daño evidente en la estructura de *H. contortus* (Figura 1S₁, 1T₁, 2S₁ y 2T₁ del Artículo 2).

Finalmente, es posible observar en la región anal del parásito la presencia de agregados de material similar al observado en la cápsula bucal. Estas fueron más evidentes en parásitos expuestos a extractos de PRT en condiciones *in vitro*. Probablemente una fracción del material que fue consumido es excretada por el ano. Igualmente puede ser originado a partir de una nueva asociación entre una fracción del tanino liberado desde el interior del nemátodo y proteína que se encuentre localizada en la región anal. En cualquiera de los dos casos es posible que la presencia de este material pueda favorecer la obstrucción del ano. Posiblemente este material se adhiere a las mucosas del parásito (Figura 1S₃ del Artículo 2).

Recapitulando, se sugiere como posible modo de acción, una obstrucción de la cavidad bucal que ocasiona una reducción o inhibición del consumo y como consecuencia de esto la inanición del NGI. Adicionalmente, es posible que durante el tránsito de este material por el organismo del parásito provoque una disfunción en el balance de fluidos y una degeneración hidrópica causando daños que pueden llegar a ser irreversibles para las células. El resultado final de estos eventos sería una menor capacidad de alimentación que daría origen a una menor eficiencia reproductiva e incluso la muerte de los parásitos adultos de *H. contortus*. Estudios histoquímicos y moleculares son necesarios para verificar y confirmar este mecanismo de acción.

Penetración de los taninos a través de la superficie de los NGI

La cutícula y la epidermis junto con la musculatura son probablemente órganos “blanco” de los compuestos de las PRT. Los extractos de taninos (experimentos *in vitro*) o estos compuestos presentes en el follaje de PRT frescas en forma de bolo alimenticio en el abomaso (experimentos *in vivo*), probablemente se adhieren a la cutícula debido a las glicoproteínas que la conforman (Figura 1 S₂, S₃, T₂ y T₃ y Figura 2 T₂ del Artículo 2). En el caso de *H. contortus* las evidencias en esta tesis muestran que los acúmulos vegetales se

encuentran principalmente en la cápsula bucal y en algunas ocasiones en el aparato reproductor. En contraste a estos hallazgos, en *T. colubriformis* éstos acúmulos se presentan en una mayor proporción de la superficie de la cutícula del parásito intestinal (datos no incluidos en esta tesis). Esto sugiere que las características propias de la cutícula de cada nemátodo pueden interactuar de diferente forma con las PRT aunado al diferente ambiente que se encuentra cada parásito.

Por otra parte, un pH de 5 en los poros de la cutícula de un nemátodo (Mottier et al., 2006) es favorable para que un nuevo complejo tanino-proteína pueda formarse, y este complejo pudiera pasar a través de los poros y llegar a la hipodermis, zona basal y llegar hasta el músculo. En el paso de estos compuestos desde la cutícula, hasta el músculo, los canales de Na^+ y K^+ pueden ser perturbados. La alteración de la bomba de Na^+ y K^+ puede provocar un cambio osmótico provocando una alteración del balance de fluidos y una degeneración hidrópica que terminan disminuyendo los valores de pH (McGavin and Zachary, 2007). Con un pH por debajo de 5, probablemente los taninos se disocian nuevamente y se encuentren en su forma libre, causando severos daños celulares. La evidencia patológica son los cambios presentados en los NGI sometidos a las PRT como la vacuolización en la región muscular con la consecuente inflamación de los miocitos, cambios mitocondriales con vacuolas en su citoplasma y sus crestas (Figura 2 del Artículo 3). El diagnóstico presuntivo de estos cambios patológicos, al igual que la hipótesis anterior, está asociado a una necrosis coagulativa. Este mecanismo de acción, es similar al reportado para algunas drogas AH como las moléculas del benzimidazol, las cuales por lipoafinidad y por gradiente de concentración penetran por difusión pasiva al interior de los parásitos (Mottier et al., 2006). Este modo de acción sugiere que los compuestos de las PRT pueden provocar lesiones en su motilidad y enormes daños celulares debido al proceso de vacuolización y la inflamación o lisis de los organelos. El resultado es una amenaza a la homeostasis de *H. contortus* resultando en su eventual muerte. Esta hipótesis, permitiría explicar los resultados obtenidos *in vitro*, cuando la actividad AH de extractos de PRT ha sido evaluada mediante las pruebas de inhibición de la motilidad larvaria y de adultos (Alonso-Díaz et al., 2008a; Paolini et al., 2004). De igual forma estudios

histoquímicos y moleculares son necesarios para verificar este mecanismo de acción de las PRT.

Acción Oxidativa

Esta hipótesis se encuentra relacionada a las dos anteriores dado que precisa la presencia de los taninos en el interior del organismo para que la acción oxidativa pueda desencadenarse. Existen tres posibles mecanismos por los que la acción oxidativa puede tener un efecto AH. Primero, es bien conocido que los polifenoles son quelantes de metales. Por ejemplo, monómeros de TC como la catequina, se une a los iones de metales como el hierro (Fe^+) (Perron y Brumaghim, 2009). Dado que *H. contortus* es hematófago, el consumo de Fe^+ es inevitable al consumir la hemoglobina obtenida de los eritrocitos. En este caso la acumulación observada en la región bucal pudieran ser explicados como acúmulos tanino- Fe^+ . Así, en forma de este complejo serían ingeridos por los nemátodos. La posibilidad de que estos complejos sean disociados depende siempre del pH (Perron y Brumaghim, 2009). Estos complejos son muy estables cuando el pH en presencia de hierro esta en el rango de 7-9 o por debajo. Así, la hipótesis es que cuando estos complejos se disocian, el hierro queda libre al igual que los taninos en el organismo de los nemátodos. El hierro está implicado en muchas vías y condiciones de estrés oxidativo, además de ser el principal generador del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y generación del radical hidroxilo (OH) que lesiona el DNA y otras biomoléculas (Bhat y Hadi, 1994; Martínez-Flores et al., 2002; Perron y Brumaghim, 2009).

Paradójicamente, el hecho de que los polifenoles se unan a metales es una de las razones por la que los taninos son conocidos como antioxidantes, ya que son agentes “localizadores” de radicales. Sin embargo, en este trabajo los resultados sugieren que, bajo ciertas condiciones, estos compuestos probablemente no tienen esta función cuando son ingeridos por un NGI. De este hecho surge la propuesta de un segundo mecanismo de posible actividad oxidativa.

El segundo mecanismo se sustenta en evidencia sobre el cambio en la función antioxidante de los compuestos polifenólicos (taninos). Existen reportes que demuestran que estos compuestos pueden cambiar de un estado antioxidante a un estado pro-oxidante

(Rosin, 1984; Martínez-Flores et al., 2002; Perron y Brumaghim, 2009). Este fenómeno resulta de la rápida autooxidación de los fenoles cuando se encuentran bajo una condición alcalina (altos pH), lo que favorecería la generación de peróxido de hidrógeno y radicales libres (Rosin, 1984; Barbehenn et al., 2006). Ambos mecanismos, resultan en la producción de oxidantes, con el consecuente daño al NGI.

Debido a que normalmente los parásitos están en contacto con especies reactivas de oxígeno (ERO) cuando los fagocitos del hospedero (eosinófilos, neutrófilos y macrófagos) generan las ERO a través de la acción de la enzima NADHP-oxidasa (Smith, 1989). Las ERO y las especies reactivas de nitrógeno (ERN) dañan proteínas, ácidos nucleicos y lípidos de membrana y pueden matar a los nemátodos (Lee, 2002). Las lesiones encontradas en este trabajo sugieren un severo daño en el metabolismo de los nemátodos, probablemente todos los mecanismos antioxidantes son comprometidos, especialmente aquellos que inhiben la acción de las enzimas antioxidantes.

El parásito hematófago *H. contortus* necesita desintoxicarse de las ERO derivadas de la ingestión de una hemoglobina rica en oxígeno (Bagnall y Kotze, 2004). Cuando el hospedero consume PRT, el NGI necesitará no solo desintoxicarse de las ERO sino también de las ERN derivados de la ingestión y del contacto con los compuestos nutracéuticos. Lee (2002) y Bagnall y Kotze (2004), mencionan que las enzimas antioxidantes para los nemátodos son catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, peroxiredoxinas y ascorbato peroxidasa; antioxidantes no enzimáticos como la vitamina E (α -tocopherol) y la C (ascorbato), glutatión, ubiquinol y albumina. Además, Hadás y Stankiewicz (1998) encontraron que en las especies de *Trichostrongylus colubriformis*, *H. contortus* y *Ostertagia circumcincta* la superoxidasa dismutasa está involucrada en mecanismos de protección de daño de los tejidos que se origina en un proceso oxidativo y de fagocitosis. La inflamación y vacuolización de las mitocondrias (Figura 2 y 3 del Artículo 3) sugieren una inhibición de la acción de la enzima superoxidasa dismutasa con respecto a lo reportado por Hadás y Stankiewicz (1998).

De manera similar, la catalasa juega un rol importante en la defensas de *H. contortus* contra el peróxido de hidrógeno producido como parte de la explosión respiratoria y los fagocitos activados (Kotze y McClure, 2001; Bagnall y Kotze, 2004) y la

peroxiredoxina tiene un rol importante al permitir que el nemátodo adulto de *H. contortus* se desintoxique del peróxido de hidrógeno (Bagnall y Kotze, 2004). El severo proceso de vacuolización mostrado en el músculo y en el intestino (Figura 2b y Figuras 3bcd del Artículo 3) debido a los tratamientos con las PRT sugiere que la respuesta de las células a la explosión respiratoria fue dañada o alterada; sugiriendo que la acción de la catalasa y la peroxiredoxina fueron probablemente neutralizadas.

En resumen, la posible inducción de un proceso oxidativo ocasiona que toda la economía del parásito este en peligro. Los radicales libres provocarían severos daños en las células causando daño irreversible y muerte de los diferentes organelos de la misma. Es necesario realizar test bioquímicos y moleculares para poder discernir estos mecanismos con mayor precisión.

Puede concluirse que el mecanismo de acción directo es probablemente una combinación de severas alteraciones en varios sistemas del *H. contortus*, teniendo los compuestos de las PRT como órganos blanco principalmente el intestino y el músculo. Los compuestos de las PRT pudieran provocar la inhibición de su motilidad, nutrición y reproducción. En esta tesis se ha desarrollado modelos posibles para la explicación de un proceso patológico en los NGI causado por las PRT. Los procesos patológicos encontrados (alteraciones en la estructura y ultraestructura del NGI) y los posibles mecanismos de acción presentados permitirían explicar/sustentar los efectos AH atribuidos a las PRT y sugerir su uso como estrategia más dentro de un programa control integral de las nematodiasis en los pequeños rumiantes. Es necesario realizar estudios químicos y moleculares de mayor profundidad para poder entender mejor esta acción AH.

EFECTO INDIRECTO

Considerando que los TC de las PRT, protegen la degradación de la proteína sobrepasante en el rumen del hospedero y que esto puede provocar muy probablemente una mayor disponibilidad y absorción de aminoácidos (Ramos et al., 1998; Muller-Harvey, 2006), la respuesta celular de la mucosa del TGI puede verse favorecida. Este mayor aporte de nutrientes son la base para la probable acción indirecta de las PRT a las poblaciones de nemátodos (Waghorn et al., 1994ab; Reed, 1995; Ramos et al., 1998; Barry y McNabb,

1999; Hoste et al., 2006; 2008). El mayor aporte de nutrimentos estaría contribuyendo a un incremento en la resiliencia del hospedero contra los NGI (Hoste et al., 2008). Este efecto ha sido demostrado en numerosos trabajos de suplementación en pequeños rumiantes, donde se ha encontrado que tanto la suplementación energética como proteica tienen un positivo sobre la resiliencia de los pequeños rumiantes infectados con NGI (Gutiérrez-Segura et al., 2003; Torres-Acosta et al., 2004; 2006). Sin embargo, la mejora en la resistencia (respuesta inmune) no ha sido observada consistentemente. El mecanismo por el cual un mayor aporte de nutrientes mejora la resiliencia ha sido atribuido a una mayor disponibilidad de nutrientes para reparar daños en mucosa, restitución de la sangre perdida (con parásitos hematófagos), generación de anticuerpos y mantener la ganancia de peso (Hoste et al., 2005). No obstante, todavía se requiere comprobar estos mecanismos.

Otro mecanismo de acción indirecto está relacionado con el consumo de las PRT. Al consumir PRT, los taninos pudieran adherirse a proteínas encontradas en la saliva del rumiante (Alonso-Díaz et al., 2010). Existe evidencia de que la proteína salival de ovinos y caprinos pudiera contener histatinas (Alonso-Díaz et al., comunicación personal). Este tipo de proteína se une principalmente a monómeros de TC formando enlaces débiles, los cuales se disocian en ambientes ácidos (abomaso), permitiendo así la presencia potencial de taninos libres los cuales pudieran ser absorbidos por la mucosa del TGI (Wróblewski et al., 2001). Además, dentro de un proceso normal de parasitosis, sobre todo por *H. contortus*, la mucosa se inflama y hay producción de moco por la presencia misma de los parásitos (Linklater y Smith, 1993) y hay evidencia de la presencia de histonas nucleares en el músculo, probablemente derivado de una degradación de las células epiteliales superficiales (Pemberton et al., 2009). Al lesionarse el epitelio de la mucosa abomasal, los taninos condensados libres, que normalmente no pueden ser absorbidos debido a su gran tamaño, serían absorbidos. Se ha hipotetizado que la presencia o absorción de los taninos generaría una respuesta que es asociada con un incremento en el número de las células inflamatorias presentes en la mucosa. No obstante, existen discrepancias en los resultados reportados por diferentes autores (Paolini et al., 2003ab; Tzamaloukas et al., 2006; Brunet et al., 2008; Ríos-De-Alvárez et al 2009) así como los obtenidos en los experimentos de los Artículos 1 y 4 de esta tesis. Podemos hipotetizar que los taninos más que provocar que las células

(eosinófilos, leucocitos globulares y mastocitos) ataquen a los parásitos de manera directa, muy probablemente incrementen su número dando como resultado un proceso oxidativo localizado. Como resultado indirecto de la presencia o absorción de taninos en el TGI, los NGI adultos son expuestos (de manera aguda o crónica) a radicales (originadas de peróxido de hidrógeno, explosión oxidativa) que van destruyendo sus células.

En contraste con Pérez et al. (2001) quienes encontraron que los eosinófilos y linfocitos (precursores de los leucocitos globulares) se localizaban rodeando a larvas de *H. contortus* de apariencia anormal, y un incremento considerable de eosinófilos y la acción fulminante de los eosinófilos sobre las L₃ descritas por Meeusen et al. (2005). En los estudios histopatológicos realizados en los experimentos de los Artículos 1 y 4 y en el estudio de Brunet et al. (2008), no se encontraron secciones de parásitos rodeados de eosinófilos u otra célula inflamatoria.

En resumen, aún no está completamente dilucidado el mecanismo de acción del efecto indirecto, por lo que se necesitan más estudios para poder conocer la acción de los taninos sobre la respuesta o inmunidad celular. Igualmente son necesarios protocolos inmunohistoquímicos y patológicos que nos permitan conocer las lesiones patológicas de la mucosa gastrointestinal para obtener el mecanismo de la reacción inflamatoria cuando interactúan los NGI adultos y las PRT.

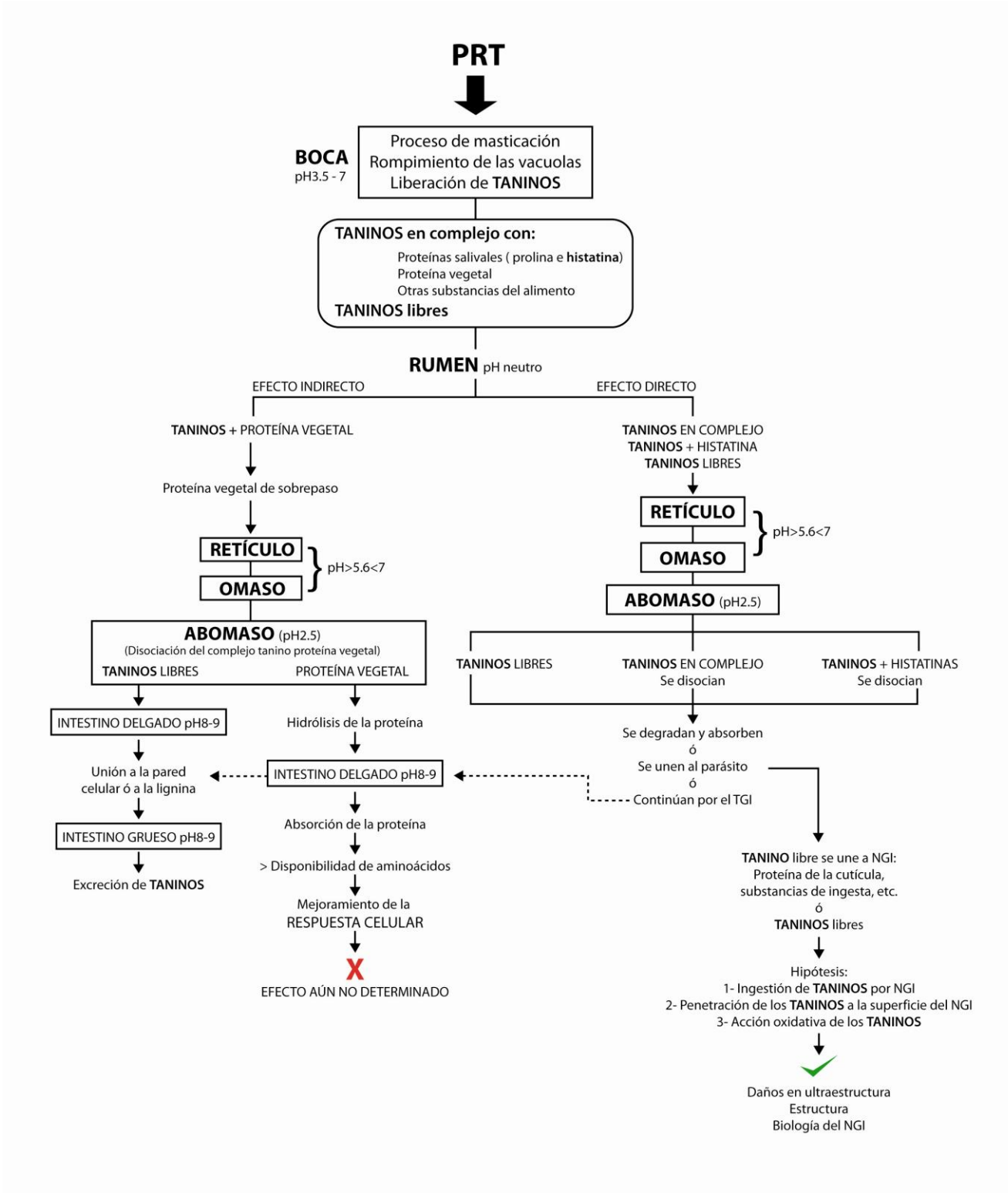


Figura 11. Esquema del posible mecanismo de acción de las PRT, denotando los efectos directo (determinado) e indirecto (no determinado) de los taninos sobre la población adulta de los NGI.
PRT: plantas ricas en taninos, TGI: tracto gastro-intestinal, NGI: nemátodos gastro-intestinales.

8. CONCLUSIONES

- Es necesario considerar los factores inherentes y los factores externos de la utilización de las PRT como AH no convencionales en las producciones de pequeños rumiantes.
- El efecto directo recae en la hipótesis de una serie de procesos de asociación y disociación de los taninos por su paso por el organismo de nemátodos causando daños celulares importantes asociados principalmente a una acción oxidativa: Los taninos como prooxidantes.
- El efecto indirecto incurre en la hipótesis de una cascada de sucesos que desencadena un aumento en las células de la mucosa (eosinófilos, leucocitos globulares y mastocitos), que liberan agentes oxidantes que terminan por dañar al parásito presente en la mucosa gastrointestinal.
- Se determinó el efecto directo *in vitro* e *in vivo* de dos plantas y un extracto ricos en taninos, sobre la ultraestructura y la estructura externa de los parásitos adultos de *Haemonchus contortus*.
- Se determinó el efecto directo *in vivo* del consumo de dos plantas y un extracto ricos en taninos condensados sobre la biología de los parásitos adultos de *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis* en pequeños rumiantes.
- No se determinó de manera concluyente el efecto indirecto, de las dos plantas y el extracto ricos en taninos estudiados, sobre los parásitos adultos *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis* en pequeños rumiantes.

9. REFERENCIAS

- Alonso-Díaz, M.A.; Torres-Acosta, J.F.J.; Sandoval-Castro, C.A.; Hoste, H.; Aguilar-Caballero, A.; Capetillo-Leal, C.M. (2008). Is goats' preference of forage trees affected by their tannin or fiber content when offered in cafeteria experiments? *Animal Feed Science and Technology*. 141:36-48.
- Alonso-Díaz, M.A.; Torres-Acosta, J.F.J.; Sandoval-Castro, C.A.; Hoste, H.; Aguilar-Caballero, A.J.; Capetillo-Leal, C.M. (2009). Preference of tanniferous tree fodder offered to sheep and its relationship with *in vitro* gas production and digestibility. *Animal Feed Science and Technology*. 151:75-85.
- Alonso-Díaz, M.A.; Torres-Acosta, J.F.J.; Sandoval-Castro, C.A.; Hoste, H. (2010a). Tannins in tropical tree fodders to small ruminants: A friendly foe? *Small Ruminant Research*. 89:164-173.
- Alonso-Díaz, M.; Torres-Acosta, J.; Sandoval-Castro, C.; Capetillo-Leal, C. (2010b). Polyphenolic compounds of nutraceutical trees and the variability of their biological activity measured by two methods. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 12:649-656.
- Athanasiadou, S.; Githiori, J.; Kyriazakis, I. (2007). Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction. *Animal*. 1:1392-1400.
- Athanasiadou, S.; Kyriazakis, I.; Giannenas, I.; Papachristou, T.G. (2009). Nutritional consequences on the outcome of parasitic challenge on small ruminants. En: *Nutritional and foraging ecology of sheep and goats*. Options Méditerranéennes. 85:29-40.
- Bagnall, N.H.; Kotze, A.C. (2004). cDNA cloning expression patterns of a peroxiredoxin, a catalase and glutathione peroxidase from *Haemonchus contortus*. *Parasitology Research*. 94:283-289.
- Barbehenn, R.V.; Jones, C.P.; Hagerman, A.E.; Karonen, M.; Salminen, J.P. (2006). Ellagitannins have greater oxidative activities than condensed tannins and galloyl glucoses at High pH: Potential impact on caterpillars. *Journal of Chemistry and Ecology*. 32:2253-2267.
- Barry, T.N.; Mc Nabb, W.C. (1999). The effect of condensed tannins in temperate forages on animal nutrition and productivity. En: *Tannins in livestock and human nutrition: ACIAR Proceedings* (BROOKER, ed.). Canberra, Australia Pp. 30-35.
- Bhat, R.; Hadi, S.M. (1994). DNA breakage by tannic acid and Cu(II): generation of active oxygen species and biological activity of the reaction. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*. 313:49-55.
- Bennick, A. (2002). Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 13:184-196.
- 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.
- Butter, N.L.; Dawson, J.M.; Buttery, P.J. (1999). Effects of dietary tannins on ruminants. In: *Secondary Plant Products*. Nottingham-University-Press, Nottingham, Pp. 51-70.
- Calderón-Quintal, J.A.; Torres-Acosta, J.F.J.; Sandoval-Castro, C.A.; Alonso-Díaz, M.A.; Hoste, H. (2010). Adaptation of *Haemonchus contortus* to condensed tannins: can it be possible? *Archivos de Medicina Veterinaria*. In press.

Cenci, F.B.; Louvandini, H.; McManus, C.M.; Dell'porto, A.; Costa, D.M.; Araujo, S.C.; Minho, A.P.; Abdalla, A.L. (2007). Effects of condensed tannin from *Acacia mearnsii* on sheep infected naturally with gastrointestinal helminthes. *Veterinary Parasitology*. 144:132-137.

Gutiérrez- Segura, I.; Torres-Acosta, J.F.J.; Aguilar-Caballero, A.J.; Cob-Galera, L.; May-Martínez, M.; Sandoval-Castro, C.A. (2003). Supplementation can improve resilience and resistance of browsing criollo kids against nematode infections during the wet season. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 3:537-540.

Hadás, E.; Stankiewicz, M. (1998). Superoxide dismutase and total antioxidant status of larvae and adults of *Trichostrongylus colubriformis*, *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta*. *Parasitology Research*. 84:646-650.

Hoste, H.; Torres-Acosta, J.F.; Paolini, V.; Aguilar-Caballero, A.; Etter, E.; Lefrileux, Y.; Chartier, C.; Broqua, C. (2005). Interaction between nutrition and gastrointestinal infections with parasitic nematodes in goats. *Small Ruminant Research*. 60:141-151.

Hoste, H.; Jackson, F.; Athanasiadou, S.; Thamsborg, S M.; Hoskin, S O. (2006). The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology*. 22:253-261.

Hoste, H.; Torres-Acosta, J.F.J.; Aguilar-Caballero, A.J. (2008). Nutrition-parasite interactions in goats: is immunoregulation involved in the control of gastrointestinal nematodes? *Parasitology Immunology*. 30:79-88.

Hoste, H.; Sotiraki, S.; Landau, S.Y.; Jackson, F.; Beveridge, I. (2010). Goat-Nematode interactions: think differently. *Trends in Parasitology*. 26:376-381.

Jean-Blain, C. (1998). Aspects nutritionnels et toxicologiques des tanins. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 149:911-920.

Lee, D. (2002). *The Biology of Nematodes*. CRC Press. Boca Raton, Florida U.S.A. Pp. 1-60.

Linklater, K.; Smith, M.C. (1993). *Diseases and disorders of the sheep and goat*. Mosby-Wolfe. Torino, Italy. Pp. 45-46.

Kotze, A.C.; McClure, S.J. (2001). *Haemonchus contortus* utilises catalase in defence against exogenous hydrogen peroxide in vitro. *International Journal of Parasitology*. 31:1563-1571.

Manolaraki, F.; Sotiraki, S.; Stefanakis, A.; Skampardonis, V.; Volanis, M.; Hoste, H. (2010). Anthelmintic activity of some mediterranean browse plants against parasitic nematodes. *Parasitology*. 137:684-696.

Martínez-Florez, S.; González-Gallego, J.; Culebras, J.M.; Tuñón, M.J. (2002). Flavonoids: Properties and Antioxidizing action. *Nutrición Hospitalaria*. 17:271-278.

Martínez-Ortiz-de- Montellano, C.; Vargas-Magaña, J.J.; Canul-Ku, L.; Miranda-Soberanis, R.; Capetillo-Leal, C.; Sandoval-Castro, C.A.; Hoste, H.; Torres-Acosta, J.F. (2010). Effect of a tropical tannin-rich plant, *Lysiloma latisiliquum* on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary Parasitology*. 172:283-290.

Max, R.A.; Kimambo, A.E.; Kassuku, A.A.; Mtenga, L.A.; Buttery, P.J. (2004). The effect of wattle tannin drench or an acacia meal supplement on faecal egg counts and total worm burdens of tropical sheep with an experimental nematode infection. En: Smith, T., Godfrey, S.H., Buttery, P.J., Ssewanyana, E. and Owen, E. (Eds.), *Small stock in development: Proceedings of a workshop on enhancing the contribution of small livestock to the livelihoods of resource-poor communities*, Masaka, Uganda. 15-19 November 2004. Natural Resources International Ltd., Aylesford, UK. Pp. 63-71.

- Max, R.A.; Kassuku, A.A.; Kimambo, A.E.; Mtenga, L.A.; Wakelin, D.; Buttery, P.J. (2009). The effect of wattle tannin drenches on gastrointestinal nematodes of tropical sheep and goats during experimental and natural infections. *Journal of Agriculture Science*. 147:211-218.
- Meeusen, E.N.T.; Balic, A.; Bowles, V. (2005). Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 108:121-125.
- Mendéz-Ortíz, F.A. (2009). Efectos de la inclusión de *Havardia albicans* sobre el consumo, digestibilidad de la dieta y carga parasitaria de *Haemonchus contortus* en ovinos de pelo. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, México.
- Mottier, L.; Alvarez, L.; Ceballos, C.; Lanusse, C. (2006). Drug transport mechanisms in helminth parasites: Passive diffusion of benzimidazol anthelmintics. *Experimental Parasitology*. 113: 49-57.
- Mueller-Harvey, I. (2006). Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86:2010-2037.
- McGavin, M. D.; Zachary, J.F. (2007). *Pathologic basis of veterinary disease*. 4th Edition. Mosby Elsevier. Pp. 9-22.
- McSweeney, C.S.; Palmer, B.; Mc Neill, D.M.; Krause, D.O. (2001). Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 91:83-93.
- McSweeney, C.S.; Collins, E.M.C.; Blackall, L.L.; Seawright, A.A. (2008). A review of anti-antinutritive factors limiting potential use of *Acacia angustissima* as a ruminant feed. *Animal Feed Science and Technology*. 147:158-171.
- Paolini, V.; Frayssines, A.; De La Farge, F.; Dorchies, Ph.; Hoste, H. (2003a). Effects of condensed tannins on established populations and on incoming larvae of *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta* in goats. *Veterinary Research*. 34:331-339.
- Paolini, V.; Bergaud, J.P.; Grisez, C.; Prevot, F.; Dorchies, Ph.; Hoste, H. (2003b). Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 113:253-261.
- Paolini, V. ; Fouraste I. ; Hoste, H. (2004). *In vitro* effects of three woody plant and sainfoin extracts on third-stage larvae and adult worms of three gastrointestinal nematodes. *Parasitology*. 129:67-77.
- Paolini, V.; De La Farge.; Prevot, F.; Dorchies, P.; Hoste, H. (2005). Effects of the repeated distribution of sainfoin hay on the resistance and the resilience of goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*. 127:277-283
- Pemberton, A.D.; Brown, J.K.; Goldfinch, G.; Athanasiadou, S.; Smith, W.D. (2009). Mucus and the mucosal response to parasites: Lessons from Proteomics. En: *Memorias de la World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*. Del 11 al 13 de Agosto de 2009. Calgary, Canada. Pp. 95-96.
- Pérez, J.; García, P.M.; Hernández, S. (2001). Pathological and immunohistochemical study of the abomasum and abomasal lymph nodes in goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Research*. 32:463-473.
- Pérez-Maldonado, R.A.; Norton, B.W. (1996). The effects of condensed tannins from *Desmodium intortum* and *Calliandra calothyrsus* on protein and carbohydrate digestion in sheep and goats. *British Journal of Nutrition* 76:515-533.

- Perron, N.R.; Brumaghim, J.L. (2009). A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochemistry Biophysics*. 53:75-100.
- Ramos, G.; Frutos, P.; Giráldez, F.J. Mantecón A.R. (1998). Los compuestos secundarios de las plantas en la nutrición de los herbívoros. *Archivos de Zootecnia*. 47:597-620.
- Reed, J.D. (1995). Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal Animal Science*. 73:1516-1528.
- Ríos-De Alvarez, L.; Greer, A.W.; Jackson, F.; Athanasiadou, S.; Kyriazakis, I.; Huntley, J.F. (2008). The effect of dietary Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on local cellular responses to *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Parasitology*. 135:117-1124.
- Rochfort, S.; Parker, A.J.; Dunshea, F.R. (2008). Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry*. 69:299-322.
- Rosin, M.P. (1984). The influence of pH on the convertogenic activity of plant phenolics. *Mutation Research-Genetic Toxicology*. 135:109-113.
- Rothwell, J.T.; Sangster, N.C. (1996). The Effects of Closantel Treatment on the Ultrastructure of *Haemonchus contortus*. *International Journal of Parasitology*. 26:49-57.
- Smith, R.M.; Curnutte, J.T.; Mayo, L.A.; Babior, B.M. (1989). Use of an affinity label to probe the function of the NADPH binding component of the respiratory burst oxidase of human neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*. 21:12243-12248.
- Terril, T.H.; Waghorn, G.C.; Woolley, D.J.; McNabb, W.C. (1994). Assay and digestion of ¹⁴C-labelled condensed tannin in the gastrointestinal tract of sheep. *British Journal of Nutrition*. 72:467-477.
- Torres-Acosta, J.F.; Jacobs, D.E.; Aguilar-Caballero, A.; Sandoval-Castro, C.; May-Martinez, M.; Cob-Galera, L.A. (2004). The effect of supplementary feeding on the resilience and resistance of browsing Criollo kids against natural gastrointestinal nematode infections during the rainy season in tropical Mexico. *Veterinary Parasitology*. 124:217-238.
- Torres-Acosta, J.F.J.; Jacobs, D.E.; Aguilar.Caballero, A.J.; Sandoval-Castro, C.; Cob-Galera, L.A.; May-Martínez, M. (2006). Improving resilience against natural gastrointestinal nematodes infections in browsing kids during the dry season in tropical Mexico. *Veterinary Parasitology*. 135:163-173.
- Torres-Acosta, J.F.J.; Hoste, H. (2008). Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Ruminant Research*. 77:159-173.
- Tzamaloukas, O.; Athanasiadou, S.; Kyriazakis, I.; Huntley, J. F.; Jackson, F. (2006). The effect of chicory (*Cichorium intybus*) and sulla (*Hedysarum coronarium*) on larval development and mucosal cell responses of growing lambs challenged with *Teladorsagia circumcincta*. *Parasitology* 132:419-426.
- Villalba, J.J.; Provenza, F.D. (2007). Self-medication and homeostatic behavior in herbivores: learning about the benefits of nature's pharmacy. *Animal*. 9:1360-1370.
- Waghorn, G.; Shelton, I.D.; Mc Nabb, W.C. (1994a). Effect of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on its value for sheep 1. Non-nitrogenous aspect. *Journal of Agriculture Science*. 123:99-107.

Waghorn, G.; Shelton, I.D.; Mc Nabb, W.C.; Mccutcheon, S.N. (1994b). Effects of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on its value for sheep 1. Non-nitrogenous aspect. *Journal of Agriculture Science*. 123:109-119.

Waghorn, G. (2008). Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production-Progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology*. 174:116-139.

Wróblewski, K.; Muhandiram, R.; Chakrabarty, A.; Bennick, A. (2002). The molecular interaction of human salivary histatins with polyphenolic compounds. *European Journal of Biochemistry*. 268:4384-4397.

Zimmer, N.; Cordesse, R. (1996). Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *INRA Production Animale*. 9:167-179.