



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**



**EFICACIA ENDOPARASITICIDA *IN VIVO* E *IN VITRO* DE LACTONAS
MACROCÍCLICAS EN ANTÍLOPES ADDAX (*Addax nasomaculatus*) EN
CAUTIVERIO**

por


Sebastián Enrique FIDALGO MIGUEZ


**TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Medicina Veterinaria**

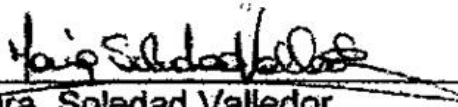
MODALIDAD: Situación Problema

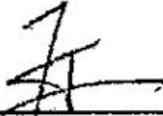
**MONTEVIDEO
URUGUAY
2023**


PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de mesa: 
_____ Dr. César Echaidés

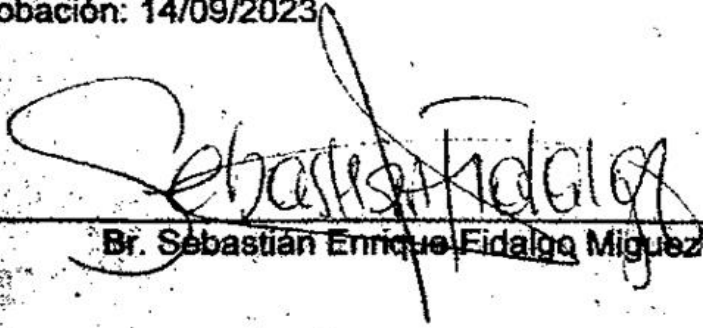
Segundo miembro (Tutor): 
_____ Dr. Matías Villagrán

Tercer miembro: 
_____ Dra. Soledad Valledor

Cuarto miembro (Co tutor): 
_____ Dr. Gonzalo Suárez

Quinto miembro (Co tutor): 
_____ Prof. Oscar Correa

Fecha de aprobación: 14/09/2023

Autor: 
_____ Br. Sebastián Enrique Fidalgo Miguez

AGRADECIMIENTOS

A Mamá y Papá,
A Jero y Amigos,
A la Universidad de la República (UDELAR), a la Universidade Estadual Paulista (UNESP) y Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (UDCA),
A Matías Villagrán, Oscar Correa y Gonzalo Suárez,
Al Parque Lecocq,
A cada una de las personas que me brindó su apoyo durante este camino,

¡Muchas Gracias!

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
TABLA DE CONTENIDO.....	4
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	6
RESUMEN	7
SUMMARY	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. Nematodos gastrointestinales en rumiantes domésticos	9
1.1.1. Principales géneros de nematodos gastrointestinales en Uruguay	9
1.1.2. Técnicas de diagnóstico y evaluación de resistencia de nematodos gastrointestinales en rumiantes domésticos.....	10
1.2. Control parasitario y resistencia antiparasitaria en rumiantes no domésticos	11
1.3. Addax.....	15
1.3.1. Distribución, conservación y características morfológicas de la especie	15
1.3.2. Parásitos gastrointestinales en cautiverio del addax	17
2. HIPÓTESIS	21
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo general.....	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. MATERIALES Y MÉTODOS	22
4.1. Animales y localización.....	22
4.2. Colecta de materia fecal, determinación de HPG, test de reducción de conteo de huevos e identificación de géneros parasitarios	23
4.3. Test de sensibilidad <i>in vitro</i> para larvas de nematodos gastrointestinales..	24
4.4. Análisis estadístico	25
5. RESULTADOS	26
5.1. Distribución del recuento de huevos por gramo individual pre tratamiento .	26
5.2. Test de reducción de conteo de huevos	28
5.3. Prevalencia de géneros parasitarios.....	30
5.4. Test de eficacia larvaria <i>in vitro</i>	32
6. DISCUSIÓN	34

7. CONCLUSIONES.....	38
8. BIBLIOGRAFÍA	39

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de los principales géneros de nematodos parásitos gastrointestinales de rumiantes que se encuentran en Uruguay extraído de Fiel, C., y Nari, A. (2013).....	9
Figura 2. Ejemplar de hembra adulta de antílope addax (<i>Addax nasomaculatus</i>) perteneciente a la población del Parque Lecocq (Montevideo, Uruguay).....	17
Figura 3. Ejemplo de uno de los recintos donde se alojaba uno de los grupos de addax del Parque Lecocq usados en el estudio.	22
Figura 4. Distribución del recuento de huevos por gramo (HPG) en antílopes addax (<i>Addax nasomaculatus</i>) del Parque Lecocq pre tratamiento (día 0) subcutáneo con 200µg/kg de moxidectina (CYDECTIN 1%). La línea punteada azul indica el valor de 200 HPG.....	26
Figura 5. Distribución del recuento de huevos por gramo (HPG) pre tratamiento (día 0) subcutáneo con 200µg/kg de moxidectina (CYDECTIN 1%) en antílopes addax (<i>Addax nasomaculatus</i>) del Parque Lecocq de acuerdo a corral en que se encontraban los animales.....	27
Figura 6. Distribución del recuento de huevos por gramo (HPG) pre tratamiento (día 0) subcutáneo con 200µg/kg de moxidectina (CYDECTIN 1%) en antílopes addax (<i>Addax nasomaculatus</i>) del Parque Lecocq según al sexo. Los machos están representados mediante un triángulo y las hembras mediante un punto negro.	27
Figura 7. Recuento individual de HPG de los antílopes addax (<i>Addax nasomaculatus</i>) del Parque Lecocq al día 0 y al día 15 post tratamiento subcutáneo con 200µg/kg de moxidectina (CYDECTIN 1%). Cada color representa el número de identificación de la caravana de cada animal.	28
Figura 8. Variación del recuento individual de HPG según el sexo de los antílopes addax (<i>Addax nasomaculatus</i>) del Parque Lecocq al día 0 y al día 15 post tratamiento subcutáneo con 200µg/kg de moxidectina (CYDECTIN 1%).....	29
Figura 9. Variación del recuento individual de HPG según el corral (1, 2 y 6) de los antílopes addax (<i>Addax nasomaculatus</i>) del Parque Lecocq al día 0 y al día 15 post tratamiento subcutáneo con 200µg/kg de moxidectina (CYDECTIN 1%).....	29
Tabla 1. Prevalencia de géneros de nematodos parásitos gastrointestinales encontrados pre y post tratamiento antiparasitario con 200µg/kg de moxidectina (CYDECTIN® 1%) de los antílopes addax (<i>Addax nasomaculatus</i>) del Parque Lecocq.....	31
Figura 10. Dispersión de la actividad motil de las larvas de nematodos gastrointestinales obtenidas de los coprocultivos de los antílopes addax (<i>Addax nasomaculatus</i>) del Parque Lecocq, evaluada a las 0 (gráfico superior), 19 (gráfico del medio) y 72 h (gráfico inferior) luego de la exposición <i>in vitro</i> a dimetilsufóxido 2% (control), concentración mínima de ivermectina (IVM 5µM) y concentración máxima de ivermectina (IVM 10µM).....	33

RESUMEN

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto antiparasitario de dos lactonas macrocíclicas *in vivo* (moxidectina) e *in vitro* (ivermectina) sobre nematodos gastrointestinales de antílopes addax (*Addax nasomaculatus*) en cautiverio. La población seleccionada fue de 17 individuos adultos nacidos en el Parque Lecocq (Montevideo, Uruguay). Para el estudio *in vivo*, se recolectaron fecas de los animales pre y post dosificación (15 días) con moxidectina (200µg/kg, 1%, subcutánea) y se determinó la cantidad de huevos por gramo (hpg) y los géneros de nematodos gastrointestinales presentes. Con los conteos de hpg, se realizó un test de reducción de contaje de huevos. Con las larvas obtenidas pre y post dosificación, se realizó un ensayo *in vitro* evaluando su motilidad al enfrentar las mismas a dos concentraciones de ivermectina (IVM 05µM e IVM 10µM). Si bien el estudio *in vivo* no disminuyó significativamente el contaje en los coproparasitarios de los antílopes, la exposición *in vitro* durante 19 h disminuyó la motilidad de las larvas de nematodos gastrointestinales para ambas concentraciones evaluadas. De los cultivos de larvas se identifica *Haemonchus* spp como el género de mayor prevalencia. El presente estudio, demuestra el beneficio de la aplicación complementaria de estudios de sensibilidad parasitológica *in-vivo* e *in-vitro* como herramienta alternativa que favorecen a la comprensión del uso de los antiparasitarios en especies silvestres en cautiverio que se encuentran en peligro de extinción.

SUMMARY

The objective of this experiment was to evaluate the antiparasitic effect of two macrocyclic lactones *in vivo* (moxidectin) and *in vitro* (ivermectin) on gastrointestinal nematodes of addax antelopes (*Addax nasomaculatus*) in captivity. The selected population was 17 adult individuals born in Parque Lecocq (Montevideo, Uruguay). For the *in vivo* study, feces were collected from the animals pre and post dosing (15 days) with moxidectin (200µg/kg, 1%, subcutaneous) and the number of eggs per gram (epg) and the genera of present gastrointestinal nematodes were determined. With the epg counts, an egg count reduction test was performed. With the larvae obtained pre and post dosing, an *in vitro* essay was carried out evaluating their motility when facing them at two concentrations of ivermectin (IVM 05µM and IVM 10µM). Although the *in vivo* study did not significantly decrease counts in antelope fecal parasites, *in vitro* exposure for 19 h decreased the motility of gastrointestinal nematode larvae for both concentrations tested. Of the larval cultures, *Haemonchus* spp is identified as the most prevalent genera. The present study demonstrates the benefit of the complementary application of *in vivo* and *in vitro* parasitological sensitivity studies as an alternative tool that favors the understanding of the use of antiparasitics in wild species in captivity that are in danger of extinction.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Nematodos gastrointestinales en rumiantes domésticos

1.1.1. Principales géneros de nematodos gastrointestinales en Uruguay

Al llegar al territorio uruguayo los bovinos y ovinos trajeron consigo los principales géneros de nematodos gastrointestinales que parasitan a rumiantes en el país. Los géneros que afectan principalmente a los bovinos son *Cooperia* spp., *Ostertagia* spp., *Trichostrongylus* spp. y *Haemonchus* spp., mientras que a ovinos son *Haemonchus* spp. y *Trichostrongylus* spp. (Castells, Nari, Gayo, Mederos y Pereira, 2013).

Como se muestra en la Figura 1, el ciclo de vida de estos nematodos se define como directo, sin involucrar un hospedero intermediario. Se caracterizan por cuatro mudas y cinco estados entre larva y adulto, los huevos son eliminados con las heces al medio externo, donde en condiciones adecuadas de temperatura y humedad, en menos de quince horas evolucionan a larvas de primer estadio. Las larvas de primer estadio (L1) de hábitos bacteriófagos, muda a un segundo estadio (L2), y luego un tercer estadio (L3). Todos los trichostrongilídeos tienen la particularidad que su L3 conserva la vaina de L2, lo que le brinda una mayor resistencia en el ambiente. La L3 migra por las pasturas y cuando su hospedero se alimenta, ingresan a él junto con el alimento. Según la especie de nematodo, una vez en abomaso o intestino, pierden su vaina protectora y se instalan en el órgano. Una vez radicado en su órgano nicho, continúan mudando hasta adultos machos o hembras, para luego copular e iniciar la deposición de huevos que saldrán al exterior con las heces (Giudici, Entrocasso y Steffan, 2013).

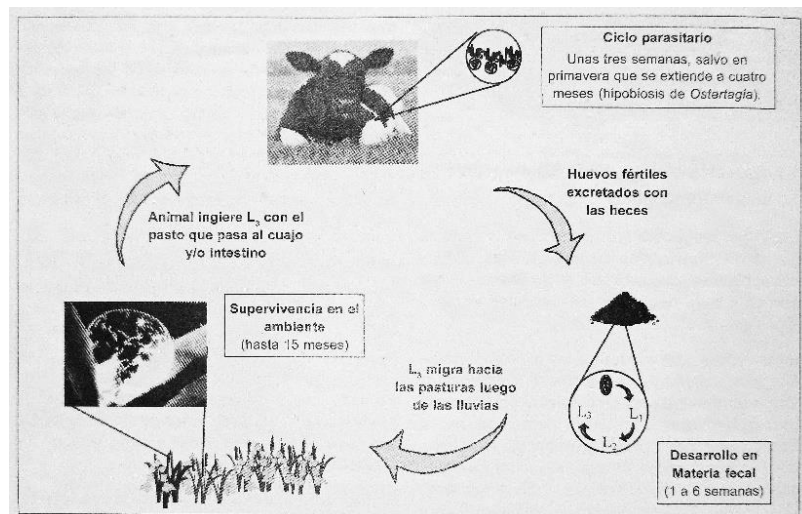


Figura 1. Ciclo biológico de los principales géneros de nematodos parásitos gastrointestinales de rumiantes que se encuentran en Uruguay extraído de Fiel, C., y Nari, A. (2013)

El período pre patente de los trichostrongilídeos varía desde las 2 hasta las 4 semanas, pudiendo llegar hasta los 32 días en el caso de *Haemonchus* spp. Los huevos de éstos géneros parasitarios son elípticos, con una cáscara formada por 3 capas, y en su interior una mórula conformada por blastómeros cuyo número variará según la especie (Giudici et al., 2013). De todos los trichostrongilídeos, en Uruguay quien merece mayor importancia es *Haemonchus* spp., no solo por su patogenicidad, sino que también por las pérdidas económicas que genera en la producción ovina (Castells et al., 2013). Éste nematodo es uno de los principales de clima tropical y templado y se aloja en el abomaso de numerosas especies de ungulados siendo visible a simple vista midiendo entre 10 y 30mm. La hembra adulta tiene un alto potencial biótico, depositando de 5000 a 10000 huevos por día, los cuales son liberados al medio exterior con las heces, permitiendo que existan entre cuatro y cinco generaciones por año (Giudici et al., 2013).

En Uruguay, las formas libres de *Haemonchus contortus* se reducen durante el invierno, cuando tienen menores posibilidades de seguir con su desarrollo, encontrando las mejores condiciones de sus formas libres durante el otoño. En estudios realizados en ovinos ya que es la especie más susceptible con la que contamos en el país, las mayores cargas se pudieron encontrar durante el otoño, pero al ser un parásito muy dinámico, si ocurren veranos lluviosos o inviernos cálidos, ocurren brotes de la enfermedad (Fernández y Remedi, 2015).

1.1.2. Técnicas de diagnóstico y evaluación de resistencia de nematodos gastrointestinales en rumiantes domésticos

La demostración de la presencia de huevos en heces evidencia que un animal se encuentra parasitado por nematodos. Aunque el recuento de huevos en heces no demuestra la cantidad de parásitos en el tracto digestivo, constituye una herramienta de alta valoración técnica y práctica para el control de las parasitosis en rumiantes. Las principales ventajas que nos ofrecen los recuentos en heces son su practicidad, su bajo costo y los resultados se obtienen casi inmediatos (Fiel, Steffan y Ferreyra, 2011). La técnica de Mc Master Modificada (Robert y O'Sullivan, 1949) es ampliamente utilizada en el control parasitario en sistemas de producción, en el test de reducción de conteo de huevos (TRCH) y en la estimación preliminar de eficacia antihelmíntica.

La resistencia antihelmíntica se define como la capacidad de los parásitos a sobrevivir a dosis terapéuticas de antihelmínticos. Esta capacidad es heredable haciendo que luego de un tratamiento los parásitos resistentes sobrevivan y transmitan esta capacidad de generación en generación (Prichard, 1994). La evaluación de la efectividad de productos con acción parasitaria en animales de importancia económica es una práctica de gran interés para el control de endoparásitos y conocer si existe resistencia antihelmíntica. Esta actividad, además de permitir comparar la potencialidad entre los principios activos, permite detectar su grado de adaptación a los parásitos (Lorga et al., 2019). Cualquiera sea el método que se use para evaluar la resistencia antihelmíntica, es fundamental contar

con datos de anamnesis como la categoría de los animales, manejo del pastoreo, plan sanitario y fundamentalmente con el historial de desparasitaciones de los últimos 2-3 años. Con respecto al historial de desparasitaciones, lo ideal sería poder contar con datos como frecuencia de uso, principios activos, nombre comercial y dosis utilizadas (Fiel et al., 2011).

Diferentes métodos han sido desarrollados para evaluar resistencia antihelmíntica, desde test *in vivo* hasta test *in vitro*. Pero sin dudas, el TRCH es el más simple, económico y práctico. En general, las pruebas *in vitro* sirven para evaluar la acción de las drogas antiparasitarias exponiendo huevos o larvas a diferentes concentraciones de principio activo para obtener una curva de dosis respuesta que permite conocer la CL50 y compararla con la curva correspondiente de aislados de referencia susceptibles y resistentes. Los test *in vitro* más utilizados son el test de eclosión de huevos (TEH) y el test de desarrollo larval (TDL) (Caracostantogolo, Anziani, Romero, Suarez y Fiel, 2013).

Actualmente existen reportes de resistencia antihelmíntica a varios principios activos de la familia de las lactonas macrocíclicas en rumiantes domésticos en diferentes partes del mundo (Lorga et al., 2019; Lopes et al., 2014), e incluso majadas de ovinos resistentes a todos los principios activos disponibles en el mercado, ocasionando que se recurran a otras alternativas como la combinación de drogas con diferentes mecanismos de acción y la utilización de dosis superiores a las recomendadas (Cezar et al., 2011). Aunque existen reportes de resistencia lateral a la moxidectina en rebaños tratados con otras lactonas macrocíclicas, la resistencia a la moxidectina parece desarrollarse más lentamente, por lo que la convierte en un buen candidato a ser combinado con otros fármacos en casos de multiresistencia (Cezar et al., 2011). Igualmente, siempre que se recurra a la combinación de principios activos en poblaciones multi resistentes, la combinación debe basarse en pruebas de efectividad de estos medicamento incluyendo cultivo de larvas.

1.2. Control parasitario y resistencia antiparasitaria en rumiantes no domésticos

Dentro de los principios activos más usados para combatir a los nematodos gastrointestinales en rumiantes no domésticos encontramos los benzimidazoles, imidazotiazoles y lactonas macrocíclicas. La elección de estas drogas se debe principalmente a su amplio rango terapéutico (Isaza, Courtney y Kollias, 1995).

A lo largo de los años, los programas de control de nematodos en animales de zoológico se han basado en la utilización de fármacos en forma empírica para disminuir o eliminar los parásitos. A pesar de que es un método eficaz, la realidad es que no se conoce ni la farmacocinética ni la dosificación necesaria para la mayoría de las especies a tratar, trayendo como consecuencia posibilidad de que ocurran sub dosificaciones que fomenten la resistencia antihelmíntica. La existencia de la resistencia antihelmíntica y la falta de nuevos fármacos que sean efectivos

han forzado la necesidad de usar otras alternativas (Fontenot, Kinney-Moscona, Kaplan y Miller, 2008).

Goossens, Vercruyse, Vercammen y Dorny (2006) evaluaron 3 protocolos de tratamiento estratégicos en siete rebaños diferentes de antílopes, cérvidos y caprinos en cautiverio durante tres temporadas de pastoreo en un zoológico de Bélgica. Se trató a los animales usando diferentes protocolos dosificando con fenbendazol o ivermectina y los resultados fueron muy variables. Se concluyó que más allá del tratamiento instaurando, lo que más influía en los resultados fue el manejo de las pasturas y heces que se realizaba en los corrales, y no el fármaco y dosis utilizada. Si bien no existe aún un consenso de cómo tratar estratégicamente los nematodos gastrointestinales en antílopes como si existe en especies domésticas, conociendo la epidemiología de cada una de las especies de nematodos, se pueden planificar tratamientos estratégicos puntuales para una especie en un determinado ambiente, sin realizar generalizaciones a todos los casos.

Cuando se usan los métodos químicos como medida profiláctica para evitar los nematodos gastrointestinales en rumiantes no domésticos, se recomienda que sean utilizados en situaciones como cuando existen casos de enfermedad clínica o sospecha de la misma, lo cual se traduce en valores de HPG altos con síntomas clínicos de helmintiasis (Nalubamba y Mudenda, 2012). El uso indiscriminado de forma “rutinaria” de los antihelmínticos con alta frecuencia de administración favorece la resistencia antihelmíntica y se ha demostrado en otras especies de animales (Isaza et al., 1995). Por otro lado, no se recomienda utilizar posteriormente a temporadas de lluvia, sino esperar más de 6 semanas para reducir la reinfección de las pasturas. La desparasitación en temporadas secas está recomendada, ya que las condiciones ambientales son menos propicias para las larvas y reduciría la eliminación de huevos durante el resto de la temporada seca y comienzo de estación de lluvia, y daría como resultado una menor cantidad de larvas que emergen de la hipobiosis (Nalubamba y Mudenda, 2012). También se debe aplicar alternancia anual de los diferentes principios activos, por ejemplo, alternando benzimidazoles y lactonas macrocíclicas. Todas las medidas químicas también deben ser acompañadas con el uso de estrategias alternativas.

En especies domésticas de rumiantes está bien descrita la defecación y pastoreo selectivo como comportamiento antiparasitario para reducir la transmisión feco-oral de los parásitos. Se sabe que estas especies evitan pastorear en los alrededores de las heces, debido a que las cargas de parásitos son mayores en esas áreas. En rumiantes salvajes no hay muchos estudios al respecto. En 2004, Ezenwa registró en tres especies de antílopes africanos mantenidos en un centro de investigación que los animales delimitaban áreas de defecación en las cuales no pastorean, y que de alguna forma esto evitaría la contaminación de las pasturas que utilizaban para alimentarse. Esta estrategia no podría ser implementada por animales en cautiverio en recintos donde no poseen suficiente espacio para seleccionar las áreas de alimentación y áreas de defecación. Los rumiantes en los zoológicos generalmente se mantienen en recintos con alta densidad de población, sin posibilidad de rotación

regular de pastos o eliminación de heces, siendo finalmente estas pasturas las que actúan como fuente de infección de los parásitos (Goossens, Dorny, Boomker, Vercammen y Vercruyssen, 2005)

En otro estudio que refleja la importancia del manejo ambiental de los animales en cautiverio, durante 12 meses se recolectaron muestras de heces cada dos semanas de diferentes especies de rumiantes no domésticos (antílopes, jirafas, gacelas y okapis) de dos zoológicos diferentes en Bélgica los cuales recibían diferentes condiciones de manejo. La principal diferencia fue que en uno de los zoológicos (Zoológico de Amberes) los animales no pastoreaban siendo alimentados con ración y las heces de los recintos eran removidas diariamente, mientras que en otro zoológico (Zoológico de Malinas) los animales pastoreaban y se hacía un manejo irregular con las heces. Si bien todos los rebaños de animales usados para el estudio presentaron huevos de nematodos en las heces, los animales del Zoológico de Amberes presentaron HPG muy bajos que se mantuvieron sin cambios importantes durante todo el estudio, mientras que en el Zoológico de Malinas muchos de los rebaños arrojaron HPG altos (Goossens et al., 2005). La principal causa que explicaría las diferencias en estos HPG son las condiciones de cría de estos animales, el comportamiento alimentario y el estrés que reciben los animales. Los ejemplares que estaban en recintos con pasturas altas y no tenían limpieza regular de las heces presentaban valores altos de HPG, esto podría ser explicado por un ambiente más favorable para la supervivencia de las L3 de diferentes nematodos y mayor posibilidad de pastoreo cerca de las heces (Goossens et al., 2005). Aunque los juveniles presentaron mayor cantidad de huevos de *Nematodirus* spp., no se puede relacionar las variaciones en el conteo de huevos con el sexo o con la edad de los animales.

En 2008, un estudio piloto realizado en Disney's Animal Kingdom se reportó la eficacia de la utilización de bolos de óxido de cobre intra ruminales en antílopes en cautiverio. En el trabajo se incluyeron 13 animales pertenecientes a las especies *Oryx dama*, *Hippotragus equinus*, *Antilope cervicapra* y *Damaliscus pygargus phillipsi* que habían sido diagnosticados con *Haemonchus* spp. mediante la realización de HPG previo a su tratamiento. A estos animales se les colocó un bolo de 12,5 gramos de óxido de cobre mediante sonda estomacal. Durante los siguientes 35 días, se les realizó un HPG cada 7 días para calcular el índice de reducción de conteo de huevos. Los resultados del estudio demostraron que el tratamiento con óxido de cobre fue eficaz, generando una reducción significativa en el conteo de huevos de todos los animales tratados, llegando en algunos casos hasta el 100%. El mecanismo de acción exacto que tiene el cobre sobre los parásitos aún se desconoce (Fontenot et al., 2008). Aunque existen estos y muchos otros métodos recomendados que han mostrado tener resultados prometedores como la estimulación de la respuesta inmunitaria del animal, el control biológico, la fitoterapia, entre otros, igualmente deben complementarse con los métodos químicos convencionales para lograr resultados eficaces (Cezar et al., 2011).

Los errores en el uso de los métodos químicos para controlar los nematodos gastrointestinales han favorecido la aparición de cepas de parásitos resistentes. La

falla en el resultado de un antihelmíntico no solo es resultado de resistencia antihelmíntica, existen otros factores que pueden determinar un fracaso en el tratamiento. Dentro de estos factores podemos encontrar la sub dosificación, utilización de un principio activo incorrecto, la rápida re infección o la presencia de larvas hipobióticas (Isaza, Courtney, Kollias, 1990).

Aunque la resistencia antihelmíntica de los trichostrongilídeos ha sido reportada múltiples veces en rumiantes domésticos hace varias décadas, no fue hasta 1987 que se reportó por primera vez la existencia de resistencia antihelmíntica en ungulados no domésticos en cautiverio, siendo el primer caso reportado un caso de *Haemonchus contortus* en un antílope de la especie *Hippotragus equinus* resistente a benzimidazoles (Isaza, Courtney y Neal, 1987). Isaza et al. en 1995, reportó en 7 poblaciones de diferentes especies de antílopes en Florida, Estados Unidos, que los géneros de nematodos que más parasitaban los animales eran en primer lugar *Haemonchus* spp. y en segundo lugar *Trichostrongylus* spp. Los huevos de estos parásitos fueron enfrentados a diferentes concentraciones de tiabendazole *in vitro* y se intentó establecer si existía resistencia y si estaba relacionada con antecedentes de uso de esta droga como control antihelmíntico. Los resultados de este estudio arrojaron una prevalencia del 85% de resistencia antihelmíntica, y que estaba relacionado con el uso frecuente de esta familia de antihelmínticos, siendo así uno de los primeros reportes de poblaciones de parásitos resistentes a antihelmínticos (Isaza et al., 1995). Este estudio dejó en evidencia que la resistencia antihelmíntica ya estaba instaurada en poblaciones de ungulados no domésticos y que era más grave de lo que se suponía hasta entonces. Por otro lado, la estrecha relación que existe en algunos lugares entre rumiantes domésticos y no domésticos, puede introducir cepas resistentes entre especies generando consecuencias muy graves (Nalubamba y Mudenda, 2012). Posteriormente, los casos de resistencia antihelmíntica en poblaciones de rumiantes no domésticos comenzaron a ser reportados comúnmente. Por ejemplo, la resistencia de *Haemonchus* spp. contra lactonas macrocíclicas en rumiantes no domésticos ha sido reportada en una jirafa en cautiverio en Florida, Estados Unidos (Garretson, Hammond, Craig y Holman, 2009). También en 2020, en Texas, Estados Unidos, se reportó en pool de muestras de heces de diferentes antílopes en cautiverio que el nematodo que se encontraba con mayor prevalencia era *Haemonchus* spp., el cual en un ensayo demostró una alta resistencia contra benzimidazoles, levamisol e ivermectina, mientras que fue susceptible a moxidectina (Swenson, Haefele y Poppenga, 2020).

Durante el 2020, en Texas, Estados Unidos, se registró tres casos de sospecha de intoxicación por moxidectina en tres especies diferentes de antílopes en cautiverio en los días posteriores a la administración del antiparasitario, ocasionando la muerte de los animales, convirtiéndose en el primer reporte de intoxicación por moxidectina en mamíferos no domésticos (Swenson et al., 2020). Previamente varios estudios habían reportado casos de intoxicación por moxidectina en rumiantes domésticos, en quienes los signos de intoxicación aparecen entre las 2-24 horas post administración del principio activo, y la duración de los signos clínicos oscila entre las 36-168 horas. Dentro de los signos clínicos descritos se incluye ataxia, hipermetría, desorientación, ptialismo, hiperestesia, temores, midriasis,

recumbencia, depresión, ceguera y coma. No existen reportes hasta el momento de intoxicación por moxidectina en mamíferos a dosis inferiores de 1 mg/kg, salvo el reporte de Swenson. La dosis usada en esos animales fue de 0,4-0,5mg/kg aproximadamente ya que el peso de los animales es estimado, y aunque haya resultado en la muerte de los animales, a la necropsia no se halló ningún *Haemonchus* spp. en el abomaso, dando a entender de la eficacia del principio activo.

En 2011, se reportó por primera vez un caso de resistencia antihelmíntica en una especie de vida silvestre en cautiverio en Zambia, en antílopes (*Aepyceros melampus*) parasitados principalmente con *Haemonchus* spp. y *Trichostrongylus* spp. Luego de dosificar oralmente con fenbendazol (5-7,5mg/kg) en un lamedero con sal a los animales durante 3 días, solo *Trichostrongylus* spp. mostró sensibilidad al principio activo. También demostró la inefectividad de desparasitar a los animales luego de las temporadas de lluvia debido a que el HPG de los animales aumentó rápidamente tendiendo cantidades similares de HPG pre tratamiento y similares al grupo control sin tratar. Esto podría deberse a que, en las semanas posteriores a temporadas de lluvia, las condiciones de humedad y temperatura aún son favorables para la eclosión de los huevos estróngilos y el desarrollo de las larvas (Nalubamba y Mudenda, 2012).

1.3. Addax

1.3.1. Distribución, conservación y características morfológicas de la especie

En el mundo existen 91 especies de antílopes, de las cuales 25 se encuentran en peligro de extinción. Dentro de estas últimas especies, 5 se encuentran en peligro crítico, siendo una de ellas el addax (*Addax nasomaculatus*) (International Union for Conservation of Nature, IUCN, Antelope Specialist Group, SSC, 2020). El *Addax nasomaculatus* es una especie de antílope africano que antiguamente se distribuía desde el Atlántico hasta el Nilo en el desierto central del Sahara (International Union for Conservation of Nature, UICN, 2016). Es una especie adaptada al desierto con pasturas dispersas que a lo largo de los años ha variado su distribución debido a la rápida disminución de los ejemplares. Se encuentra casi extinto en la naturaleza, y hasta 2005 existían pequeños grupos aislados muy fragmentados en dos o tres regiones del Sahara meridional y central (Beudels, Devillers, Lafontaine, Devillers-Terschuren y Beudels, 2005). La industria petrolera, la cacería furtiva y la presencia de vehículos motorizados en su hábitat ha generado la migración de esta especie buscando zonas más seguras, trayendo como consecuencia el desplazamiento de la especie a zonas donde son más vulnerables (Krausman y Casey, 2007; Bassett, 1975; Dolan, 1964). Aunque todos estos factores generaron una disminución drástica de la población, estudios genéticos recientes siguieron que la población de addax siempre fue baja, incluso antes de la interferencia del ser humano (Hempel et al., 2021).

Hoy en día los únicos individuos que habitan en estado salvaje de los que existe registro, son los reportados por la UICN en 2016 en el Sahara, donde sólo se documentó la presencia de 3 individuos. Luego por registros informales o no confirmados, se estima de una población en estado salvaje de 30-90 individuos maduros (Hempel et al., 2021). En contraste con esto, su población en cautiverio oscila entre 760 individuos en zoológicos en diferentes partes del mundo y unos 5000 individuos en granjas privadas (Wildt et al., 2019). Los ejemplares que se ubican en cautiverio se encuentran en parques zoológicos y reservas ubicados principalmente en Europa, África y América (Stabach et al., 2017).

Esta especie de antílope está adaptada a ambientes desérticos con escasez de recursos y situaciones críticas como temperaturas extremas con lluvias escasas, dándole la capacidad de no beber agua durante períodos de tiempo prolongado, obteniendo la misma de las plantas que consume. Físicamente, tanto machos como hembras poseen un cuerpo robusto, casi blanco durante el verano y café grisáceo durante el invierno. Como se puede apreciar en la Figura 2, presentan cuernos largos y ondulados que miden de 762 a 890 mm y presentan giros dextrógiros de 1,5 a 3 vueltas (Haltenorth y Diller, 1980). La cabeza es angosta, con pelo marrón chocolate en la frente. La cara tiene una máscara blanca característica con forma de "X" que hace contraste con su frente de color oscuro. Las orejas son angostas, y el cuello tiene pelo corto y amarronado en la región ventral. La especie posee escaso dimorfismo sexual. La altura a la cruz de los machos es de 105-115 cm, y la de las hembras entre 95-110 cm. Los machos poseen un peso de 100-125 kg, mientras que las hembras entre 60-90 kg (Haltenorth y Diller, 1980). Los machos alcanzan una madurez sexual a los 2 años y las hembras a los 3 años (Nowak, 1991). Se reproduce cada 2 años, dando una sola cría (Haltenorth y Diller, 1980) y los nacimientos pueden ocurrir durante todo el año, pero generalmente hay picos durante el invierno o inicios de primavera, luego de una gestación con una duración de 257-264 días (Krausman y Casey, 2007).

Se sabe poco sobre cómo funciona la jerarquía de la especie, pero animales en cautiverio han demostrado que en las hembras está más influenciada por la edad de los animales y no por características físicas como el peso, a diferencia de lo que ocurre en otras especies que lleva a conflictos para adquirir un rango superior. Los animales de mayor edad poseen más experiencia en la búsqueda de alimentos y evitando depredadores, siendo de ayuda para los animales más jóvenes (Reason y Laird, 1988). Los machos han manifestado conductas agresivas en cautiverio cuando hay alta densidad poblacional (Krausman y Casey, 2007; Gagliardi, 2010).

Los primeros addax que ingresaron a Uruguay fueron una pareja importada de un Zoológico de Europa. Ambos individuos estuvieron durante 12 años en un Zoológico urbano sin ningún tipo de manejo poblacional. Luego fueron trasladados al Zoológico y Parque Lecocq, cuya población era de 1 macho y 5 hembras en ese entonces. A partir de ese momento, inició un programa de crianza para preservar la especie y frenar la consanguinidad. Como nunca se introdujeron individuos nuevos, todos los animales descienden de la pareja original (Armstrong et al., 2011).

Debido a que cada año hay una menor cantidad de ejemplares de ungulados exóticos en su hábitat natural, los ejemplares que forman parte de diferentes parques o reservas adquieren un valor mayor en lo que respecta a la conservación de ejemplares y como poblaciones de estudio (Kirkwood, Gaskin y Markham., 1987), por lo tanto, debemos de aprovechar estas poblaciones para recabar toda la información posible para conservar las especies.



Figura 2. Ejemplar de hembra adulta de antílope addax (*Addax nasomaculatus*) perteneciente a la población del Parque Lecocq (Montevideo, Uruguay).

1.3.2. Parásitos gastrointestinales en cautiverio del addax

Las infecciones parasitarias por nematodos gastrointestinales son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en ungulados silvestres en cautiverio (Goossens et al., 2006). Existen registros desde 1986 de que diferentes Zoológicos en Estados Unidos plantean tener problemas en el control de parásitos en especies de antílopes, entre las especies mencionadas se encuentra el *Addax nasomaculatus*, haciendo que deban recurrir a la administración de antiparasitarios cada 2 a 3 meses. Una encuesta realizada a 59 instituciones en Estados Unidos que poseían rumiantes salvajes en su colección de animales, reveló que el control de los parásitos gastrointestinales son un problema aún mayor de lo que se encuentra reportado en la literatura (Isaza et al., 1990).

Dentro de los nematodos gastrointestinales que han sido identificados en antílopes *Addax nasomaculatus* en cautiverio en América del Norte se pueden mencionar a *Haemonchus contortus* y a *Longistrongylus curvispiculum*. Este último nematodo parasita a bóvidos de la región subsahariana y parece ser bastante específico de huésped, aunque se ha demostrado transmisión cruzada de animales silvestres a domésticos (Hoberg, Kocan y Rickard, 2001). En 1993 se logró recuperar del

contenido abomasal de un addax adulto encontrado muerto en una granja en Texas, Estados Unidos, una alta carga de *Haemonchus contortus* con una baja carga de *Longistrongylus curvispiculum* (Craig, 1993).

En 2015, se reportó por primera vez la presencia de quistes hidáticos por el cestodo *Echinococcus granulosus* en un addax macho adulto de 6 años en la región de Tunisia. El mismo presentó 5 quistes hidáticos viables, 3 en hígado y 2 en mesenterio. También el animal presentó 15 larvas de *Taenia hydatigena* (*Cysticercus tenuicollis*) adheridas al hígado y otras 18 dentro de la cavidad abdominal (Boufana, Said, Dhibi, Craig y Lahmar, 2015). La presencia de *Cysticercus tenuicollis* también quedó registrada en la necropsia de varios antílopes del Parque Lecocq, Uruguay (Gagliardi, 2010).

En 2021, mediante estudios coproparasitarios se dejó registro de 3 especies diferentes de antílopes subsaharianos que habitan el Parque Nacional Souss-Massa, en Morocco, Marruecos. Una de las especies a evaluar fue una población aproximada de 400 *Addax nasomaculatus*, y mediante la realización de estudios coproparasitarios se calculó una prevalencia del 43,7% de los huevos que correspondían a *Nematodirus* spp., 21,2% a *Trichuris* spp., y 36,2% a otros estrombilídeos no reconocidos. Mediante secuenciación de ADN se pudo reconocer que los huevos no reconocidos corresponden a *Camelostrongylus mentolatus* y *Nematodirus spathiger*, coincidiendo con estudios anteriores que también mencionan a estos dos parásitos como dentro de los principales nematodos que parasita antílopes subsaharianos. *Camelostrongylus mentolatus* parasita el abomaso y el intestino delgado de los rumiantes, mientras que *Nematodirus spathiger* solo el intestino delgado (Aissa, Rachida, Fatima y Widade, 2021).

Con respecto a los protozoarios que han sido encontrados como hallazgos accidentales en addax en cautiverio encontramos al protozoario *Cryptosporidium parvum* (Samuel, Pybus y Kocan, 2001; Zahedi, Papparini, Jian, Robertson y Ryan, 2016). También, en un estudio realizado en Israel se analizaron 49 muestras de suero de addax en busca de anticuerpos contra *Neospora* spp. y *Besnoitia* spp. Como resultado, 12 muestras presentaron serología positiva contra *Neospora caninum* mediante la técnica de MAT mientras que solo una fue positiva contra *Besnoitia besnoiti*, pero posteriormente todas las muestras fueron negativas mediante la técnica de Western Blot (Mazuz et al., 2018). Por último, en 2020 se reportó que en 80 muestras de heces recolectadas durante el 2015 en una población de addax en Marruecos analizadas mediante la técnica de Mc Master, se arrojó una prevalencia del 36,25% positivo a *Eimeria* spp. (Aissa, Rachida, Fatima y Widade, 2020).

Hasta la actualidad, se ha realizado un único estudio en la población de addax del Parque Lecocq en Uruguay que dejó registrado los géneros de nematodos y las variaciones de ellos a lo largo del año. Durante el 2010 se recolectaron muestras de los addax durante un año realizando un conteo de HPG en un total de 260 muestras de heces. Se observó una predominancia de *Haemonchus* spp. durante el verano siendo el 77% del total de las larvas cultivadas, y una cantidad inferior de 48% de

las larvas cultivadas durante el invierno. El siguiente género en orden de prevalencia fue *Trichostrongylus* spp. presentando una prevalencia del 38,6% de las larvas cultivadas durante el invierno y un 12,3% durante el verano. *Ostertagia* spp. fue el 15% de las larvas que se cultivaron durante primavera y otoño. Por último, *Cooperia* spp. y *Oesophagostomum* spp. presentaron cantidades muy inferiores con respecto a los géneros anteriores durante todo el año, llegando incluso al 0% en algunas estaciones (Gagliardi, 2010).

En este estudio no se dejó registrada la prevalencia de *Trichuris* spp. ya que su medición no fue realizada durante todo el año, porque para su diagnóstico la técnica de Mc Master de rutina suele subestimar la cantidad de huevos (Castells et al., 2013), pero sí se registró la muerte de animales jóvenes a causa de éste género parasitario (Gagliardi, 2010), con signos clínicos compatibles a los que ocurren en otras especies.

No existen muchos estudios acerca del desarrollo de respuesta inmunitaria a los parásitos en antílopes, pero en 2010 registrando el HPG de la población de addax en Uruguay, se vio que eran mayores los HPG en animales jóvenes que en maduros, siendo los más afectados los animales de entre 3-15 meses de edad, pudiendo ser resultado del momento en que la cría comienza a pastar estando en el mismo recinto contaminado por los animales adultos (Gagliardi, 2010). Esto no coincide con lo registrado en otras especies de rumiantes no domésticos por Goossens, Dorny, Boomker, Vercammen y Vercruysse (2005) quien no registró diferencias en el HPG en relación al sexo ni la edad de las poblaciones de estudio.

El único registro de resistencia antihelmíntica de un rumiante no doméstico realizado en Uruguay, fue el de Gagliardi (2010), realizado en la única población de addax existente en el país, quienes habitan en el Parque Lecocq. Los animales son tratados periódicamente con drogas antiparasitarias contra nematodos gastrointestinales, y los principios activos son alternados entre dosificaciones. Debido a que provienen de un clima desértico y no están adaptados a los parásitos de climas húmedos son desparasitados de rutina cada 2 meses. Durante los últimos 10 años las lactonas macrocíclicas fueron uno de los principios activos más utilizados, ya que son uno de los antiparasitarios más recomendados para tratar esta especie (Isaza, Courtney y Kollias, 1990).

En el Parque Lecocq se determinó que los animales addax presentan una alta falla terapéutica a la desparasitación con levamisol, ivermectina y doramectina (Gagliardi, 2010). Que estos animales hayan presentado fracaso en la terapéutica antiparasitaria no sorprende, ya que la presencia de resistencia a los antiparasitarios en rumiantes salvajes es un problema frecuente en zoológicos, siendo los benzimidazoles y las lactonas macrocíclicas los principios activos que menos eficacia tienen al momento de dosificar (Isaza et al., 1990). Pese a ello, hasta donde sabemos no existe información que evalúe la eficacia de estas drogas para la especie de antílope addax.

Las drogas a evaluar el estudio de Gagliardi (2010) fueron levamisol, doramectina, ivermectina 1% e ivermectina 3,15%, y la combinación de levamisol y doramectina, doramectina y closantel, y closantel e ivermectina 3,15%. Con respecto al levamisol, el 27% de los animales dosificados presentó una eficacia del 100%, donde *Haemonchus* spp. mostró susceptibilidad al fármaco. En el resto de los animales la eficacia fue del 50% a nula, y *Trichostrongylus* spp. y *Trichuris* spp. demostraron resistencia al principio activo. Por otro lado, dentro de las lactonas macrocíclicas evaluadas la doramectina mostró una eficacia nula a los 10 días post dosificación, pero luego de realizado el cultivo de larvas se evidenció que la cantidad de *Trichostrongylus* spp., *Ostertagia* spp., y *Oesophagostomum* spp., disminuyó de forma importante, habiendo un gran aumento del número de *Haemonchus* spp. El HPG 10 días post dosificación con ivermectina 1% presentó una eficacia menor al 75% en el 75% de los animales evaluados, siendo prácticamente menor al 50% o nula en la mayoría de los animales, mientras que con ivermectina al 3,15% la eficacia fue del 100% en casi todos los animales 30 días post dosificación. La combinación levamisol con doramectina tuvo una eficacia del 90% para *Haemonchus* spp. y del 100% para los otros géneros parasitarios 10 días luego de dosificar a los animales. Doramectina con closantel presentaron una buena eficacia para todos los géneros, y closantel con ivermectina 3,15% también demostró resultados similares a los 15 días post dosificación. *Trichuris* spp. fue el género que más rápidamente aumentaba el HPG en algunas crías.

2. HIPÓTESIS

La dosificación con lactonas macrocíclicas, específicamente moxidectina, es una alternativa eficaz para el control parasitario de nematodos gastrointestinales en *Addax nasomaculatus*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar el efecto antiparasitario *in vivo* e *in vitro* de lactonas macrocíclicas (moxidectina/ivermectina) sobre nematodos gastrointestinales de antílopes *Addax nasomaculatus* adultos en cautiverio.

3.2. Objetivos específicos

Evaluar la respuesta en el recuento de HPG posterior a la administración subcutánea de moxidectina (200µg/kg) en los antílopes adultos del Parque Lecocq.

Establecer la respuesta *in vitro* de la motilidad de las larvas L3 expuestas a dos dosis crecientes de ivermectina (05µM y 10µM) tras 19 h y 72 h de exposición.

Identificar los géneros parasitarios de nematodos gastrointestinales que actualmente están parasitando a los antílopes adultos del Parque Lecocq.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo experimental fue aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (Protocolo CEUAFVET-1077111900-000492-20).

4.1. Animales y localización

El estudio se llevó a cabo, entre septiembre a diciembre de 2020, en el Zoológico Parque Lecocq (Montevideo, Uruguay, Latitud -34.79, Longitud 56.33) y en los laboratorios de Parasitología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República, en Montevideo, Uruguay. El zoológico cuenta con una superficie de 120 hectáreas y forma parte del Área Protegida de los Humedales de Santa Lucía.

La especie objetivo de este estudio fue el antílope addax (*Addax nasomaculatus*). En el Parque, los animales de esta especie son organizados en corrales y todos los animales son identificados con caravanas y tienen implantado un microchip. Al momento de la realización del estudio el zoológico contaba con una población de 29 individuos de antílopes addax repartidos en seis corrales. De estos individuos, fueron seleccionados 18 ejemplares distribuidos en tres corrales con una cantidad de 5 a 8 individuos en cada uno (Figura 3). En estos corrales predominaban las hembras sobre los machos. Al momento del estudio, en uno de los corrales se albergaban dos crías recientemente nacidas, las que no fueron consideradas.



Figura 3. Ejemplo de uno de los recintos donde se alojaba uno de los grupos de addax del Parque Lecocq usados en el estudio.

4.2. Colecta de materia fecal, determinación de HPG, test de reducción de conteo de huevos e identificación de géneros parasitarios

En el día cero (d0) del estudio se logró coleccionar materia fecal de 17 de los 18 individuos seleccionados inmediatamente después de observar la defecación. La materia fecal (~4 gramos) fue almacenada en bolsas plásticas con máxima privación de aire, correctamente identificada y refrigerada a 4°C hasta su procesamiento.

Al día siguiente de recolectar las muestras de materia fecal (d1), se dosificaron a los animales con moxidectina (CYDECTIN® 1%, ZOETIS, Estados Unidos) a una dosis de 200µg/kg por vía subcutánea (Ranjan, Trudeau, Prichard, Von Kutzleben y Carrier, 1992; Fowler y Miller, 2003). El peso de los animales fue estimado ya que el Parque no contaba con una balanza. A los 15 días (d15) luego de la administración del antiparasitario, se volvió a recolectar muestras de materia fecal de los mismos individuos y las muestras fueron procesadas de igual manera que en el d0 (Kaplan et al., 2023).

A todas las muestras coleccionadas en el día cero (d0) y día quince (d15) se les realizó un análisis coproparasitario, al día siguiente de haberlas recolectado. Esto se realizó en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República. En el coproparasitario se determinó la cantidad de huevos de nematodos gastrointestinales por gramo de materia fresca (HPG) de cada muestra individual, de un pool de materia fecal generado a partir del mezclado de las heces de todos los individuos de cada recinto y de un pool separando por sexo de los animales de uno de los corrales. Todas las determinaciones fueron realizadas aplicando la técnica de Mc Master modificada, con solución salina azucarada (Fiel, Steffan y Ferreyra, 2011). La técnica de Mc Master es la más indicada para el diagnóstico de HPG de parasitosis gastrointestinales en esta especie (Isaza, 1990). En este caso se utilizó una solución salina azucarada con una densidad de 1.280 como medio de flotación y una cámara de Mc Master modificada con 4 celdas con un volumen de 0,5 ml cada una. La sensibilidad de la técnica fue de 40 huevos por gramo de materia fecal. La realización de esta técnica nos permitió estimar la cantidad de huevos de nematodos por gramo de materia fecal y de la carga parasitaria del animal. Además, gracias a la solución salina azucarada fue posible identificar los huevos de los géneros diferenciables por su morfología; por ejemplo, los de *Trichuris sp.*

Posteriormente, se cultivaron las larvas (L3) mediante la técnica de Roberts O'Sullivan (1950), la cual consistió en mezclar la materia fecal con vermiculita para favorecer la oxigenación. Luego esta mezcla fue guardada en una estufa de cultivo durante 7 días a 26°C, controlando diariamente temperatura y humedad para asegurar las condiciones adecuadas para la eclosión de los huevos parasitarios. Cumplidos los días, se llenó con agua destilada el recipiente con la mezcla de materia fecal y vermiculita, se cubrió con una placa de Petri e invirtió el envase, permitiendo que las larvas migren al agua.

El género de las larvas obtenidas fue identificado considerando sus características morfológicas (forma y tamaño total de la larva, presencia de vaina en la segunda muda, cantidad de células intestinales, largo de cola, entre otros) (Fiel et al., 2011). Las larvas obtenidas pre y post tratamiento fueron almacenadas en tubos eppendorf en heladera hasta la realización del desafío in-vitro.

Con los resultados de HPG pre tratamiento de cada individuo se seleccionaron aquellos que presentaron $HPG \geq 200$ para ser incluidos en el test de reducción de conteo de huevos (TRCH). La selección de estos animales aumenta la calidad del diagnóstico del test (Geurden, 2022). Este test es el más simple, económico y práctico para detectar resistencia antihelmíntica, es ampliamente utilizado en ruminantes y provee una estimación de la eficacia antihelmíntica ante infecciones naturales solamente utilizando el conteo de HPG pre y post tratamiento. Para realizar el TRCH se aplicó la siguiente fórmula: $TRCH (\%) = 1 - (HPG \text{ post tratamiento} / HPG \text{ pre tratamiento})$ (el valor será reportado junto al intervalo de confianza del 95%). Normalmente se utilizaría un grupo control para el cálculo del TRCH, pero debido a la poca cantidad de individuos de esta especie la fórmula original fue modificada (Coles et al., 1992)

4.3. Test de sensibilidad *in vitro* para larvas de nematodos gastrointestinales

El desafío fue realizado en el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República. Las larvas NGI pre-tratamiento y post-tratamiento fueron depositadas en una placa de ELISA de 96 pocillos. En cada pocillo se acondicionó aproximadamente 100 larvas en 100 μ l de solución (2% DMSO en agua destilada) para cada una de las muestras individuales y/o pooles. En todos los casos las muestras fueron sembradas al menos en dos pocillos (duplicado). En cada pocillo se adicionó alguna de las siguientes soluciones: control (DMSO 2%), concentración mínima de ivermectina (IVM 5 μ M en DMSO 2%) y concentración máxima de ivermectina (IVM 10 μ M en DMSO 2%). Las concentraciones de IVM utilizadas coinciden con aquellas reportadas por George et al. (2018) las cuales fueron reportadas como dosis discriminatorias para determinar la sobrevivencia de las larvas (vivas/muestras). La sobrevivencia fue evaluada a través de la actividad motil reportada por las larvas.

La actividad motil de las larvas fue evaluada en tres momentos, al terminar de sembrar la placa de ELISA (actividad basal o 0 hora), a las 19 y 72 horas luego de la administración de la solución (control; IVM5 μ M; IVM10 μ M) mediante el uso del equipo Microtracker Mini® (Phylum, Argentina), que cuantifica el movimiento de las L3. Entre cada medición, la placa de ELISA sembrada con las larvas y las soluciones se mantuvieron en una estufa a 24°C. Por último, la placa de ELISA sembrada fue llevada al laboratorio de Parasitología de la Facultad de Veterinaria para establecer la cantidad de larvas totales y cantidad de larvas vivas en cada pocillo mediante el uso de un microscopio invertido (Olympus, CKX41, Japón). Este dato fue utilizado para ponderar el valor de motilidad de las larvas obtenido en el Microtracker en

función de la cantidad de larvas presentes por pocillo (conteo x número larvas = valor ponderado).

4.4. Análisis estadístico

La reducción del recuento de huevos en heces post tratamiento y los conteos de motilidad larvaria se analizaron mediante modelos jerárquicos bayesianos (intervalos de confianza Bootstrap [bootCI95%] en base a 1000 simulaciones) utilizando el paquete eggCounts (Wang, Torgerson, Kaplan, George y Furrer, 2018). El porcentaje de reducción siguió las directrices de la World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology WAAVP (Coles et al., 1992, 2006). Todos los datos fueron analizados utilizando el programa R (R Core Team, 2023).

5. RESULTADOS

5.1. Distribución del recuento de huevos por gramo individual pre tratamiento

Los valores de distribución y la curva de densidad de los HPG del total de muestras de materia fecal (n=17) pre tratamiento se presenta en la Figura 4. Allí se indica el valor de 200 HPG que se utilizó como criterio de inclusión para el test de reducción del conteo de huevos (TRCH). Con este criterio quedan descartados 5 individuos en los siguientes pasos del trabajo. Como se visualiza en la Figura 4, la mayor densidad de animales tuvo conteos inferiores a 600 HPG, lo que corresponde a 12 individuos.

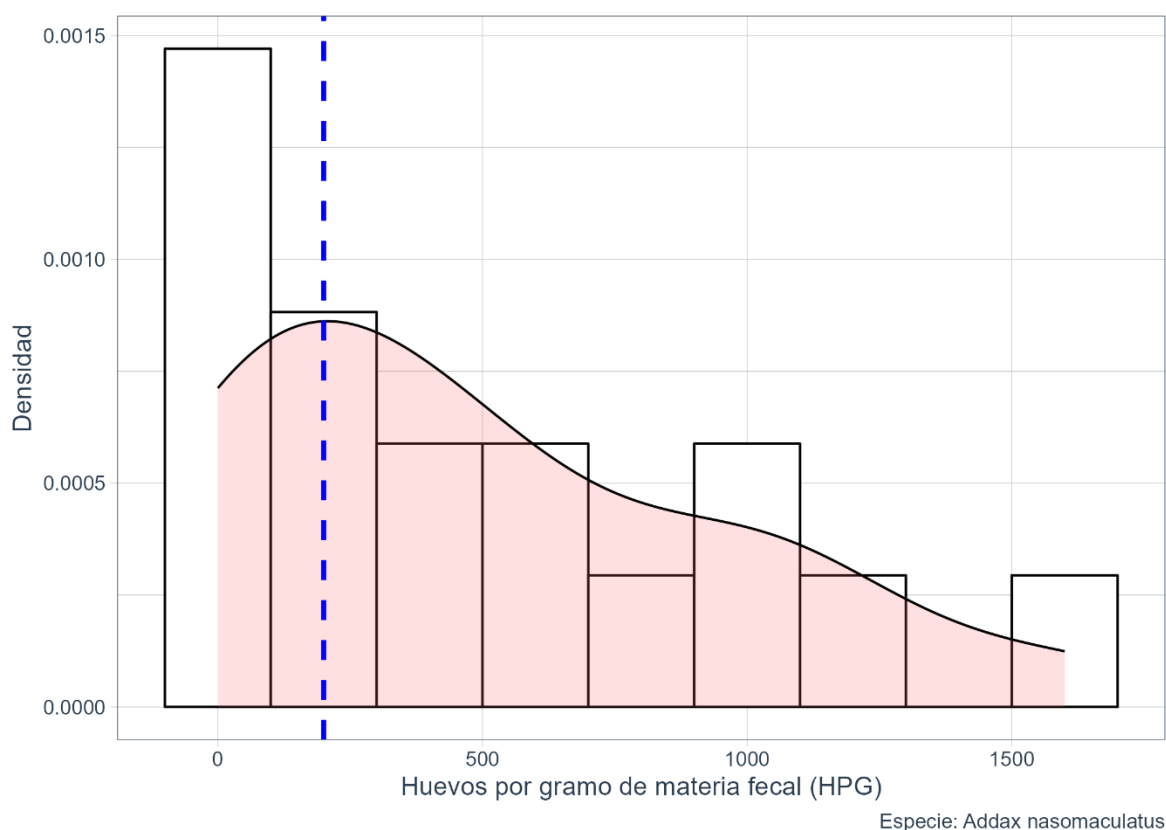


Figura 4. Distribución del recuento de huevos por gramo (HPG) en antílopes addax (*Addax nasomaculatus*) del Parque Lecocq pre tratamiento (día 0) subcutáneo con 200µg/kg de moxidectina (CYDECTIN 1%). La línea punteada azul indica el valor de 200 HPG.

En la Figura 5 se presenta la distribución de los conteos de HPG individuales pre tratamiento (día 0) disgregados según los corrales (1, 2 y 6) y en la Figura 6 según el sexo. No se aprecia una tendencia diferencial en el recuento de HPG según el corral o el sexo.

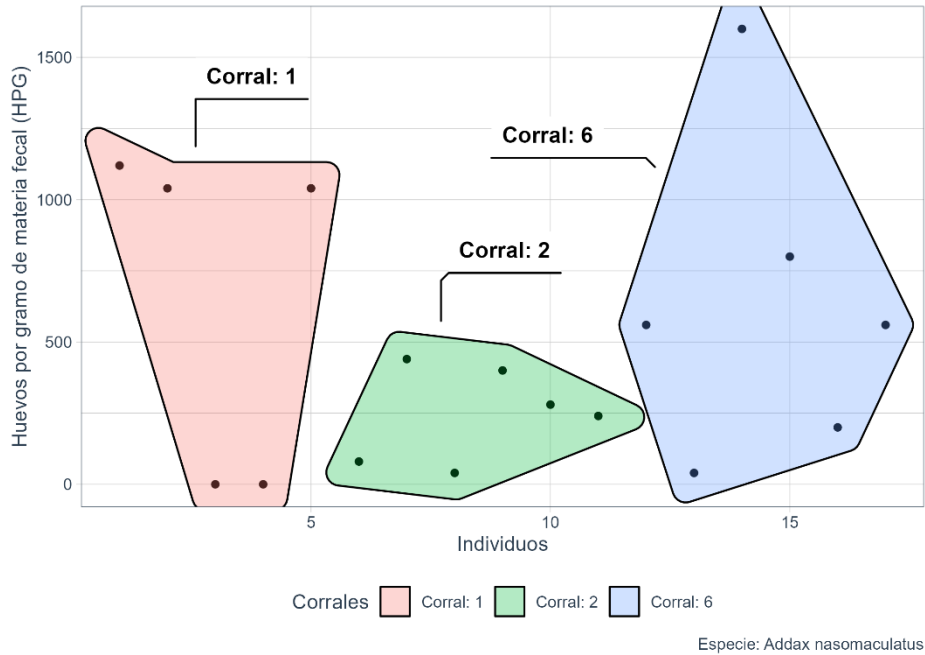


Figura 5. Distribución del recuento de huevos por gramo (HPG) pre tratamiento (día 0) subcutáneo con 200µg/kg de moxidectina (CYDECTIN 1%) en antílopes addax (*Addax nasomaculatus*) del Parque Lecocq de acuerdo a corral en que se encontraban los animales.

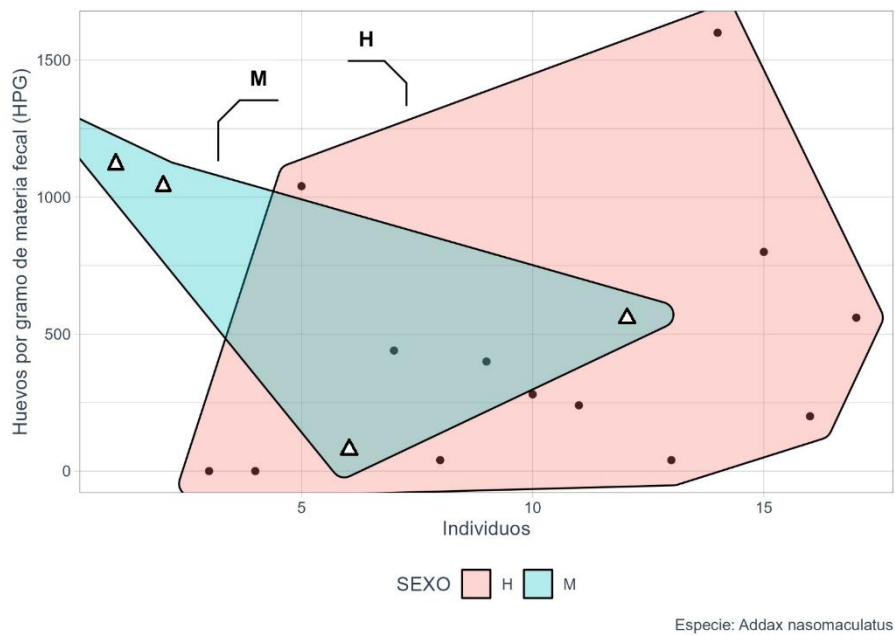


Figura 6. Distribución del recuento de huevos por gramo (HPG) pre tratamiento (día 0) subcutáneo con 200µg/kg de moxidectina (CYDECTIN 1%) en antílopes addax (*Addax nasomaculatus*) del Parque Lecocq según al sexo. Los machos están representados mediante un triángulo y las hembras mediante un punto negro.

5.2. Test de reducción de conteo de huevos

En la Figura 7 se presentan los resultados individuales de HPG previos al tratamiento antiparasitario (HPG_0, día 0) y a los 15 días posteriores a la dosificación (HPG_15) de los individuos que presentaron HPG ≥ 200 . Los cálculos de eficacia reportaron una reducción del 22% (-39:56 bootCI95%, n=1000). Únicamente 4 individuos presentaron valores post tratamiento considerablemente inferiores al pre tratamiento, alcanzando sólo uno de ellos un valor de HPG 0 post tratamiento. Para el resto de los individuos estudiados el valor post tratamiento fue similar o inferior al pre tratamiento. Al día 15 se observó una reducción en la dispersión de los datos de HPG en relación a los valores obtenidos pre tratamiento.

En las Figuras 8 y 9 se presentan los resultados pre tratamiento y post tratamiento, de acuerdo al corral y el sexo de los individuos. Para los corrales 1, 2 y 6 se reportó una reducción de 28% (-46:65 bootCI95%, n=1000), 11% (-55:70 bootCI95%, n=1000) y 20% (-80:69 bootCI95%, n=1000), respectivamente. La reducción de acuerdo al sexo fue de 30% (-100:65 bootCI95%, n=1000) para los machos y 17% (-30:57 bootCI95%, n=1000) para las hembras.

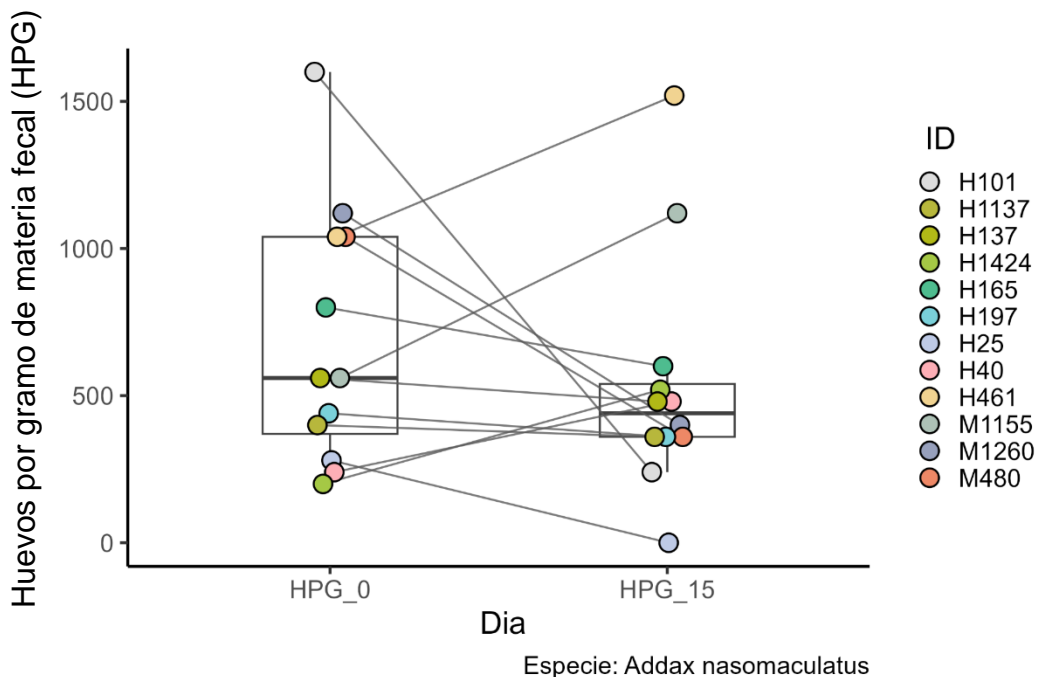


Figura 7. Recuento individual de HPG de los antílopes addax (*Addax nasomaculatus*) del Parque Lecocq al día 0 y al día 15 post tratamiento subcutáneo con 200 μ g/kg de moxidectina (CYDECTIN 1%). Cada color representa el número de identificación de la caravana de cada animal.

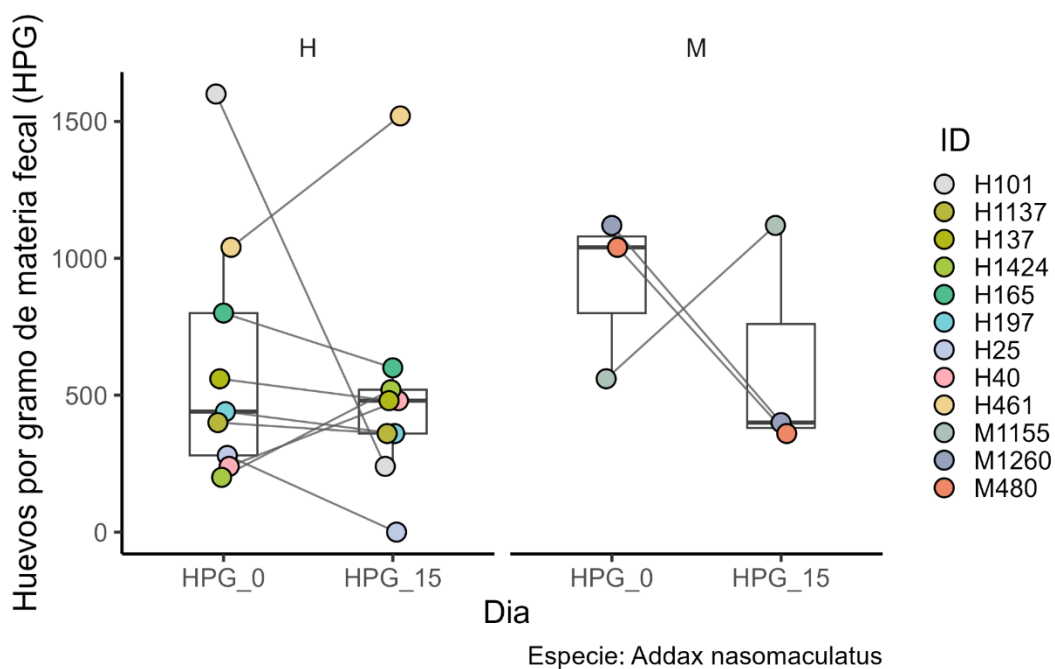


Figura 8. Variación del recuento individual de HPG según el sexo de los antílopes addax (*Addax nasomaculatus*) del Parque Lecocq al día 0 y al día 15 post tratamiento subcutáneo con 200µg/kg de moxidectina (CYDECTIN 1%).

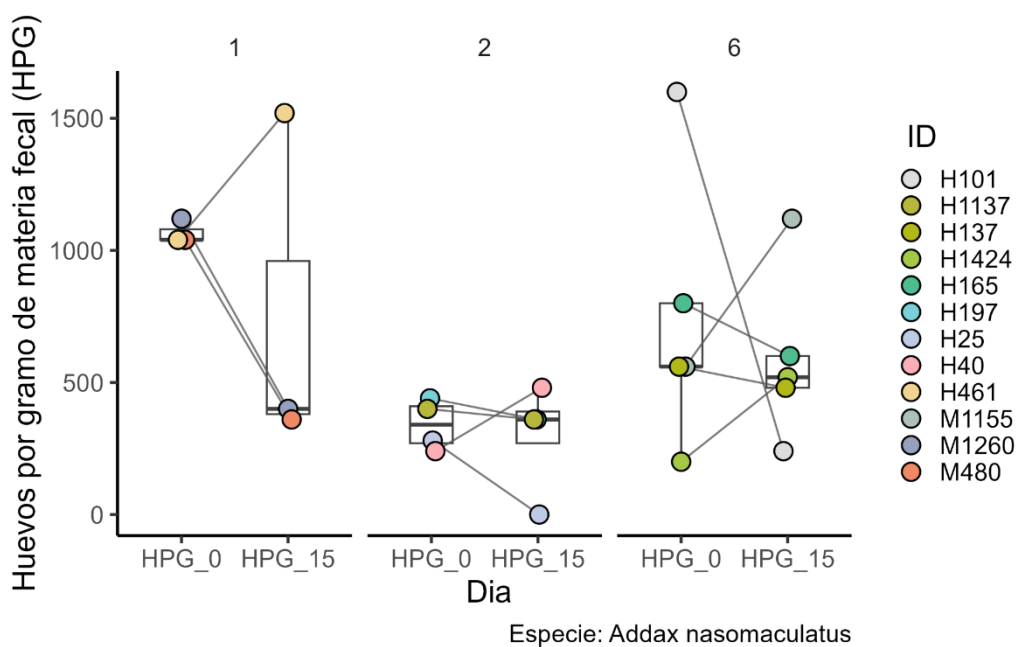


Figura 9. Variación del recuento individual de HPG según el corral (1, 2 y 6) de los antílopes addax (*Addax nasomaculatus*) del Parque Lecocq al día 0 y al día 15 post tratamiento subcutáneo con 200µg/kg de moxidectina (CYDECTIN 1%).

5.3. Prevalencia de géneros parasitarios

Los principales géneros larvarios identificados se presentan en la Tabla 1. Se evidencia una predominancia del género *Haemonchus* spp., seguido por *Trichostrongylus* spp. por sobre los demás géneros. En ningún caso se observó una variación de acuerdo al momento en relación al tratamiento.

Tabla 1. Prevalencia de géneros de nematodos parásitos gastrointestinales encontrados pre y post tratamiento antiparasitario con 200µg/kg de moxidectina (CYDECTIN® 1%) de los antílopes addax (*Addax nasomaculatus*) del Parque Lecocq.

	<i>Haemonchus</i> spp.	<i>Trichostrongylus</i> spp.	<i>Oesophagostomum</i> spp.	<i>Cooperia</i> spp.	<i>Ostertagia</i> spp.
Corral 1					
Pre tratamiento	95	5	0	0	0
Post tratamiento	93	7	0	0	0
Corral 2					
Pre tratamiento	97	3	0	0	0
Post tratamiento	100	0	0	0	0
Corral 6					
Pre tratamiento	99	1	0	0	0
Post tratamiento	98	0	2	0	0

5.4. Test de eficacia larvaria *in vitro*

En la Figura 10 se presenta la distribución de la actividad motil de las larvas registrados para el grupo control (control, dimetilsufóxido 2%), grupo concentración mínima de IVM (IVM 5 μ M) y grupo concentración máxima de IVM (IVM 10 μ M) a las 0, 19 y 72 h de exposición continua a la droga. A las 0 y las 72 h de exposición a IVM no existieron diferencias significativas entre los grupos. Entre las 24 y 48 h de exposición a la IVM se observó un agrupamiento de las larvas, formando “ovillos”. Para el grupo control a las 19 h de exposición al control no hubo una disminución significativa de la motilidad de las larvas, pero sí ocurrió a las 72 h de exposición.

A las 19 h de exposición existieron diferencias en relación al grupo control para ambos grupos expuestos a diferentes concentraciones de IVM (IVM 5 μ M e IVM 10 μ M). El grupo expuesto a IVM 5 μ M presentó una reducción en la actividad de 61% (45:74, CI95%, n=1000) a las 19 h de exposición y de 44% (16:62, CI95%, n=1000) a las 72 h de exposición en relación al tiempo 0. En el grupo expuesto a IVM 10 μ M se reportó una reducción de 51% (31:69, CI95%, n=1000) a las 19 horas exposición y de 31% (9:49, CI95%, n=1000) a las 72 horas de exposición en relación al tiempo 0.

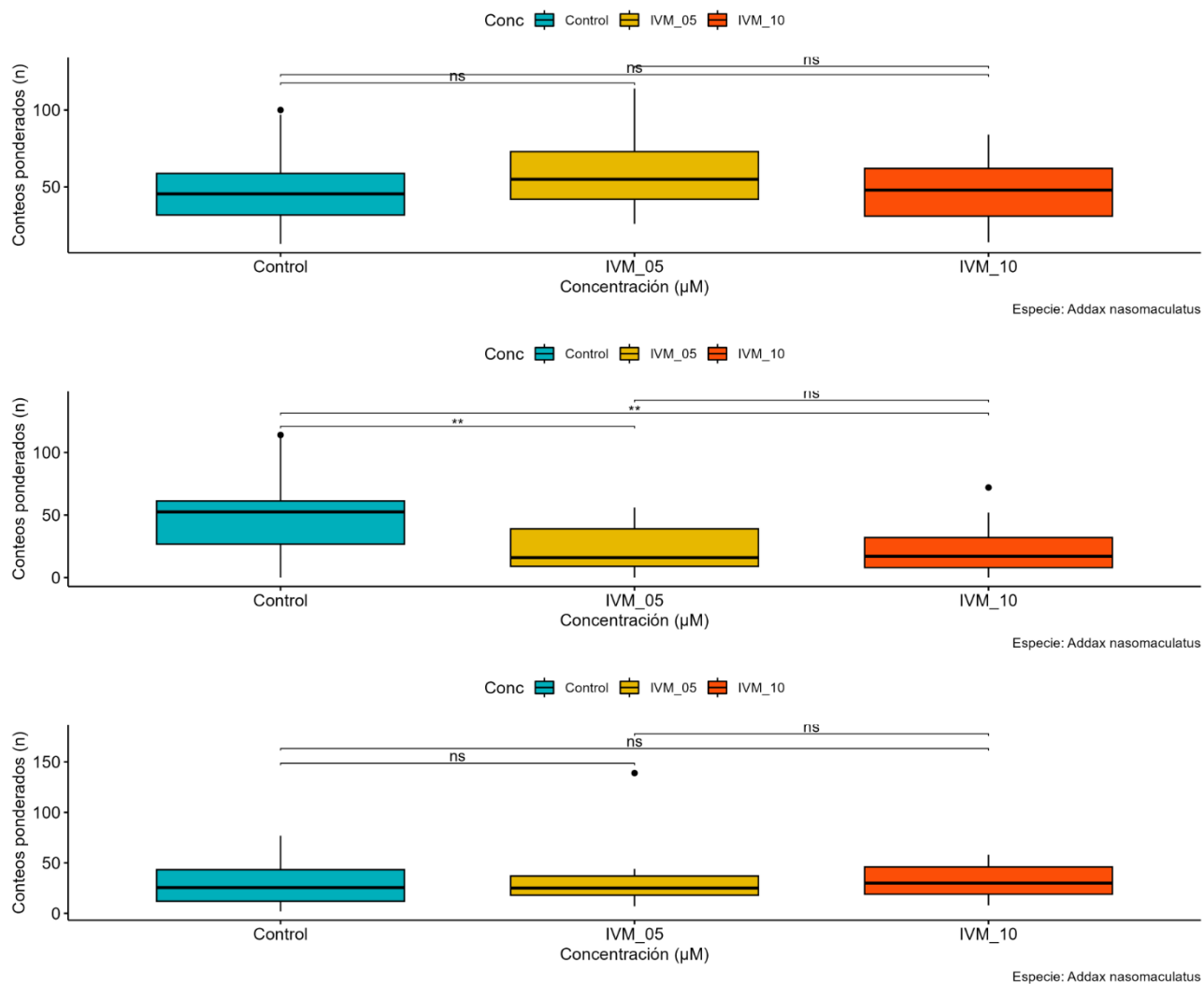


Figura 10. Dispersión de la actividad motil de las larvas de nematodos gastrointestinales obtenidas de los coprocultivos de los antílopes addax (*Addax nasomaculatus*) del Parque Lecocq, evaluada a las 0 (gráfico superior), 19 (gráfico del medio) y 72 h (gráfico inferior) luego de la exposición *in vitro* a dimetilsufóxido 2% (control), concentración mínima de ivermectina (IVM 5 μ M) y concentración máxima de ivermectina (IVM 10 μ M).

6. DISCUSIÓN

La presente tesis constituye el primer estudio que aborda la eficacia de un antiparasitario, y compara la respuesta *in vivo* e *in vitro* de larvas de nematodos gastrointestinales obtenidas de antílopes de la especie *Addax nasomaculatus*. Hasta donde conocemos, la información científica previa sobre alternativas terapéuticas, incluyendo la farmacocinética y farmacodinamia de dichos tratamientos antihelmínticos es extremadamente escasa para la especie. Esto seguramente se vincule al menos en parte con que la mayoría de las poblaciones en zoológicos son pequeñas. Por ejemplo, 19 instituciones miembro de la Asociación de Zoológicos y Acuarios (AZA) poseían en 2014 solamente 209 individuos addax (Clausen et al., 2014). Por lo tanto, el aprovechamiento de un número importante de los individuos de la población de addax del Parque Lecocq permitió generar información científica relevante para el manejo médico en cautiverio de una especie en peligro crítico de extinción.

Los HPG obtenidos de los antílopes addax del Parque Lecocq fueron muy variables entre los individuos, y la mayoría de ellos poseía HPG bajos. En la distribución de recuento de HPG no se apreciaron tendencias que sugieran variaciones entre corrales o según el sexo de los animales. Por lo tanto, para este estudio, fue posible considerar que la población de nematodos gastrointestinales de antílopes addax del Parque Lecocq era única para todos los individuos considerados. Como resultado de los coproparasitarios se obtuvo una curva de distribución de Poisson, lo que refleja que la mayoría de los animales poseyeron HPG bajos. Este comportamiento coincide con lo que se ha reportado en otras especies de rumiantes domésticos (Morales, Pino, Sandoval y G de Moreno, 1998), en que la mayoría de los individuos poseen HPG bajo y sólo unos pocos presentan altos HPG. De acuerdo a Bedotti, Cristel, Lux, Hurtado, Babinec (2018), los animales con bajos valores de HPG no deben ser contemplados en tratamientos antiparasitarios, evitando así costos innecesarios y disminuyendo la probabilidad de aparición de resistencia antihelmíntica. Por lo tanto, siguiendo este criterio y el HPG pre tratamiento, la mayoría de los individuos considerados en este estudio no deberían haber sido dosificados y por tanto incluidos en el ensayo.

No existió consistencia entre los resultados observados *in vivo* e *in vitro*. A partir de los resultados de reducción del conteo de huevos (TRCH), tanto globales como estratificados por corral y sexo, se observó una ineficacia completa del tratamiento farmacológico *in vivo* con 200µg/kg de MOX administrada por vía subcutánea. Coincidentemente, la dosificación con doramectina 1% e IVM 1% no fue efectiva para combatir los nematodos gastrointestinales en la misma población de antílope addax (Gagliardi, 2010). Por lo tanto, los presentes resultados sumado a los antecedentes en esta misma población sugieren una ineficacia importante de las lactonas macrocíclicas, lo que podría asociarse a la presencia de resistencia antihelmíntica en esta población.

La exposición *in vitro* de las larvas a diferentes concentraciones de IVM demostró una sensibilidad significativa al fármaco luego de 19 h de exposición a la misma. El

motivo por el cual las larvas presentaron una respuesta *in vitro*, pero no *in vivo* puede deberse a otros factores diferentes a la resistencia antihelmíntica: factores propios de la droga, la especie y las condiciones experimentales. Cuando se dosifica a un animal infectado de forma natural con un parásito, se está evaluando un sistema biológico completo, a diferencia de lo que ocurre *in vitro*, cuando el fármaco se expone al parásito en un entorno de laboratorio controlado y sin la influencia de los factores como la farmacocinética y la farmacodinamia de la droga en el animal (Crook et al., 2016). Por otro lado, existen diferencias químicas, farmacocinéticas y farmacodinámicas entre las avermectinas (IVM) y las milbemicinas (MOX). Estas diferencias impactan en la eficacia, resistencia, formulación y uso de estas drogas (Prichard, Ménez, Lespine, 2012). Aunque se ha observado cierta resistencia cruzada entre las avermectinas y las milbemicinas en rumiantes domésticos, los mecanismos de resistencia del parásito son diferentes. Como resultado, en algunas situaciones en las que uno de estos grupos no es altamente efectivo contra los nematodos, el otro grupo muestra una mayor eficacia a las dosis recomendadas (Prichard, Ménez, Lespine, 2012). Por ejemplo, en el ganado bovino la IVM y la MOX tienen diferente cinética en plasma y tejidos. La MOX tiene un mayor volumen de distribución y mayor tiempo de vida media en el huésped, debido a que se distribuye más rápidamente en el tejido adiposo (Lanusse et al., 1997).

Otro factor que podría haber afectado los resultados obtenidos es la dosis utilizada de las lactonas macrocíclicas. Hasta el momento no existen trabajos que indiquen cual sería la dosis correcta de IVM y MOX para dosificar a esta especie de antílope. Por esta razón, se utilizó como referencia la dosis recomendada para rumiantes domésticos. Por lo tanto, podría haber existido una sub dosificación con MOX en el tratamiento *in vivo*, lo que no habría ocurrido *in vitro* utilizando IVM. Sumado, el peso de los animales fue estimado previamente a su dosificación, lo que podría haber generado variaciones en la dosis recibida por los individuos. Si esto hubiera ocurrido podría explicar la variabilidad de los HPG observados post tratamiento, la ineficacia terapéutica *in vivo*, y estaría presionando para la aparición de resistencia antihelmíntica (Taylor, Hunt, Goodyear, 2002). Además, la vía de administración de la MOX puede cambiar su efectividad en el tratamiento, dando mejores resultados en el ganado cuando es administrada vía oral en vez de vía subcutánea o pour on (Leathwick, Miller, 2013), esto también ha sido demostrado en otras especies de rumiantes no domésticos (West, Hammond, KuKanich, 2017). En síntesis, parece necesario avanzar en la generación de información farmacológica (farmacocinética, farmacodinamia) sobre las lactonas macrocíclicas específicamente generada para el addax.

La motilidad de las larvas varió con el tiempo de exposición y con la concentración del fármaco a que se las expuso. La motilidad a las 0 h no difirió entre exponerlas a una solución control (DMSO 2%) o a diferentes concentraciones de droga IVM (5µM y 10µM). Sin embargo, a las 19 h de exposición, si bien el grupo control se mantuvo sin diferencias en relación a las 0 h, los grupos expuestos a las diferentes concentraciones de IVM redujeron su motilidad de forma significativa. Dicha respuesta no varió al aumentar 2 veces la concentración de IVM. Si bien la motilidad disminuyó de forma significativa, en ninguna de las concentraciones de IVM la

motilidad llegó a cero, lo que nos podría indicar la presencia de larvas de menor sensibilidad al principio activo.

La reducción de la motilidad generada en ambos grupos tratados con IVM se mantuvo hasta las 72 h de exposición. Sin embargo, también ocurrió una reducción de la motilidad en el grupo control. Como resultado, las diferencias observadas a las 19 h entre los tratamientos no se mantuvieron a las 72 h. Por lo tanto, ya con la concentración mínima de IVM (5µM) fue suficiente para disminuir significativamente la motilidad de las larvas en las primeras 19 h, sin embargo, este efecto se vería confundido al aumentar el tiempo de exposición debido a una tendencia a una menor motilidad de las larvas en el grupo control. El incremento de concentración no permitió visualizar un mayor impacto en la inhibición de la motilidad de las larvas.

En los coprocultivos realizados, se observó una preponderancia casi absoluta del género *Haemonchus* spp. sobre otros géneros parasitarios, lo que se mantuvo después del tratamiento, mostrando prevalencia de este género y la ineficacia del tratamiento en su control. Esto no es extraño ya que la resistencia de *Haemonchus* spp. a las lactonas macrocíclicas está ampliamente reportada en rumiantes domésticos (Lorga et al., 2019; Lopes et al., 2014) y no domésticos en cautiverio (Garretson et al., 2009). Con respecto a los otros géneros obtenidos, al existir una baja prevalencia, no podemos concluir que efectivamente exista resistencia al antihelmíntico administrado. Existe un único reporte como antecedente sobre nematodos gastrointestinales de la población de antílopes addax de Uruguay en el cual se realizaron coprocultivos durante todo un año (Gagliardi, 2010). Estos resultados coinciden en parte con este trabajo, al demostrar que algunos de los géneros de nematodos gastrointestinales que parasitan esta población son *Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp., *Oesophagostomum* spp., y *Trichuris* spp. Los géneros reportados anteriormente que no fueron encontrados en este trabajo son *Cooperia* spp., *Ostertagia* spp. y *Nematodirus* spp. Si comparamos la prevalencia de géneros obtenidos entre los meses setiembre y octubre, ambos trabajos coinciden con que *Haemonchus* spp. es el género de mayor prevalencia en esa estación del año. Por lo demostrado en estos dos trabajos, la distribución estacional de los nematodos gastrointestinales en esta especie se comporta de manera similar a lo que ocurre en los rumiantes domésticos (Fernández y Remedi, 2015).

En la interpretación de los resultados de este estudio es importante considerar que el test de reducción de contaje de huevos puede estimar con cierto error la eficacia antihelmíntica, ya que la liberación de huevos no siempre se correlaciona con la cantidad de parásitos presentes. Esto se debe en parte a que el test contempla solo la producción de huevos por parásitos adultos y no las formas larvianas que pueden estar parasitando al animal (Taylor, Hunt, Goodyear, 2002). Por otra parte, la liberación de huevos puede variar con la hora de recolección de la materia fecal (Sandoval, Morales, Jiménez, Pino y Márquez, 2002). El único género que ha demostrado tener una adecuada correlación entre la infestación parasitaria presente y la liberación de HPG es *Haemonchus* spp. pero los conteos de huevos de *Trichostrongylus* spp., *Ostertagia* spp. y *Nematodirus* spp. generalmente presentan

poca relación con la verdadera infestación parasitaria (Martin, Anderson y Harret, 1985). En este sentido con los resultados obtenidos de únicamente dos HPG no deberíamos descartar la presencia de los géneros no encontrados, sino que se deberían de realizar más conteos de HPG. A su vez, debido al limitado número de animales de la población, no pudimos contar con un grupo control, que no recibiera tratamiento. Esto hubiera permitido monitorizar los cambios en el conteo de huevos sin la influencia del uso de fármacos antiparasitarios (Taylor, Hunt, Goodyear, 2002). Por lo tanto, para próximos experimentos se podría incluir más individuos de otros corrales que no fueron incluidos en este trabajo para crear un grupo control.

En base a los resultados obtenidos en este estudio es posible realizar algunas recomendaciones prácticas a aplicar en poblaciones de antílope addax mantenidos en condiciones de cautiverio, y en especial en la población del Parque Lecocq. Se puede incluir la realización de HPG y TRCH de forma rutinaria previa dosificación y la implementación de mecanismos de control no farmacológicos para retrasar la aparición de resistencia antihelmíntica. En suma a lo anterior, también el tratamiento farmacológico únicamente a aquellos animales con HPG alto y animales con sintomatología de helmintiasis gastrointestinal es una nueva medida que podría implementar el Parque Lecocq para retrasar la aparición de resistencia antihelmíntica. Se sugiere que las lactonas macrocíclicas no sean utilizadas como control farmacológico para los nematodos gastrointestinales, pero en el caso de que sean utilizadas sean combinadas con principios activos de otras familias. Por ejemplo, las combinaciones como levamisol + doramectina, doramectina + closantel y closantel + IVM obtuvieron una eficacia muy alta en esta especie (Gagliardi, 2010). Esto se explicaría ya que la combinación de varios principios activos da mejores resultados que la utilización de una única lactona macrocíclica (Baiak, Lehnen, Rocha, 2018). Por ejemplo, la combinación de IVM con triclabendazol aumenta tres veces su disponibilidad plasmática y retrasa su eliminación en ovinos (Lifschitz, Virkel, Ballent, Sallovitz y Lanusse, 2009).

7. CONCLUSIONES

La administración de 200µg/kg vía subcutánea de MOX 1% no fue eficaz para disminuir significativamente el conteo de huevos de nematodos gastrointestinales en los coproparasitarios de los antílopes addax (*Addax nasomaculatus*) que se alojan en el Parque Lecocq.

La exposición *in vitro* durante 19 h a diferentes concentraciones de IVM (IVM 5µM e IVM 10µM) disminuyó la motilidad de las larvas de nematodos gastrointestinales obtenidas mediante coprocultivos de la población de antílopes addax (*Addax nasomaculatus*) del Parque Lecocq.

El género de nematodo gastrointestinal más prevalente en *Addax nasomaculatus* en el Parque Lecocq fue *Haemonchus* spp.

La aplicación complementaria de estudios de sensibilidad parasitológica *in-vivo* / *in-vitro* son herramientas alternativas que favorecen a la comprensión del uso de los antiparasitarios en especies en cautiverio y que se encuentran en peligro de extinción.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aissa, S., Rachida, M., Fatima, H., & Widade, O. (2020). Cross-sectional study of *Eimeria* spp. infection in three antelope species (*Addax nasomaculatus*, *Gazella dorcas* and *Oryx dammah*) maintained in the Souss-Massa National Park (Morocco). *Nature Conservation Research. Заповедная наука*, 5(S2), 77-82.
- Aissa, S., Rachida, M., Fatima, H., & Widade, O. (2021). Gastrointestinal Nematode Infections in Antelopes from Morocco: A Coprological Survey. *Acta Veterinaria-Beograd*, 71(1), 47-60.
- Armstrong, E., Leizagoyen, C., Martinez, A. M., Gonzalez, S., Delgado, J. V., & Postiglioni, A. (2011). Genetic structure analysis of a highly inbred captive population of the African antelope *Addax nasomaculatus*. Conservation and management implications. *Zoo biology*, 30(4), 399-411.
- Baiak, B. H. B., Lehnen, C. R., & da Rocha, R. A. (2018). Anthelmintic resistance in cattle: A systematic review and meta-analysis. *Livestock Science*, 217, 127-135.
- Basset, T. (1975). *Oryx* and *Addax* in Chad. *Oryx*, 13(1), 50-51.
- Bedotti, D. O., Cristel, S. L., Lux, J. M., Hurtado, A. W., & Babinec, F. J. (2018). Presencia y dinámica parasitaria en dos majadas de Cabras Criollas en el oeste de la Provincia de la Pampa, Argentina. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal AICA*, 12, 164-170.
- Beudels, R. C., Devillers, P., Lafontaine, R. M., Devillers-Terschuren, J., & Beudels, M. O. (2005). Sahelo-Saharan antelopes. status and perspectives. *Report on the conservation status of the six Sahelo-Saharan antelopes*. Bonn: UNEP-CMS.
- Boufana, B., Saïd, Y., Dhibi, M., Craig, P. S., & Lahmar, S. (2015). *Echinococcus granulosus sensu stricto* (ss) from the critically endangered antelope *Addax nasomaculatus* in Tunisia. *Acta Tropica*, 152, 112-115.
- Castells, D., Nari, A., Gayo, V., Mederos, A., & Pereira, D. (2013). Epidemiología e impacto productivo de nematodos gastrointestinales en Uruguay. En C. Fiel, y A. Nari, *Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes* (pp. 283-300). Montevideo: Hemisferio Sur.
- Caracostantogolo, J., Anziani, O., Romero, J., Suárez, V., & Fiel, C. A. (2013). Resistencia a los antihelmínticos en Argentina. En C. Fiel, y A. Nari, *Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes* (pp. 257-299). Montevideo: Hemisferio Sur.

- Cezar, A. S., Ribas, H. O., Pivoto, F. L., Sangioni, L. A., & Vogel, F. S. F. (2011). Combinação de drogas antiparasitárias como uma alternativa para o controle de nematódeos gastrintestinais multirresistentes em ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31, 151-157.
- Clausen, N., Houston, B., Their, T., Enright, W., Spevak, E., & Fisher, M. (2014). *Addax (Addax nasomaculatus) AZA animal program population viability analysis report*. Association of Zoos and Aquariums (AZA). Recuperado de [https://ams.aza.org/iweb/upload/Population%20Viability%20Analysis%20\(PVA\)%20Report%20-%202014%20Addax%20AZA%20Animal%20Program-58a15fec.pdf](https://ams.aza.org/iweb/upload/Population%20Viability%20Analysis%20(PVA)%20Report%20-%202014%20Addax%20AZA%20Animal%20Program-58a15fec.pdf).
- Coles, G. C., Bauer, C., Borgsteede, F. H., Geerts, S., Klei, T. R., Taylor, M. A., & Waller, P. J. (1992). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 44(1-2), 35-44. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(92\)90141-u](https://doi.org/10.1016/0304-4017(92)90141-u)
- Coles, G. C., Jackson, F., Pomroy, W. E., Prichard, R. K., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M. A., & Vercruyssen, J. (2006). The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 136(3-4), 167-185. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.11.019>
- Craig, T. M. (1993). *Longistrongylus curvispiculum* (Nematoda: Trichostrongyloidea) in free-ranging exotic antelope in Texas. *Journal of Wildlife Diseases*, 29(3), 516-517.
- Crook, E. K., O'Brien, D. J., Howell, S. B., Storey, B. E., Whitley, N. C., Burke, J. M., & Kaplan, R. M. (2016). Prevalence of anthelmintic resistance on sheep and goat farms in the mid-Atlantic region and comparison of in vivo and in vitro detection methods. *Small Ruminant Research*, 143, 89-96.
- Dolan, J. (1964). Notes on *Addax nasomaculatus* (de Blainville, 1816). *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 31(1), 23-31.
- Ezenwa, V. O. (2004). Selective defecation and selective foraging: antiparasite behavior in wild ungulates?. *Ethology*, 110(11), 851-862.
- Fernández Rodríguez, M. P., & Remedi Avelino, M. A. (2015). *Estudio epidemiológico parcial de las helmintiasis gastrointestinales en un rebaño de ovinos criollos del este del país* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, Udelar, Montevideo.
- Fiel, C.A., Steffan, P.E., y Ferreyra, D.A. (2011). *Diagnóstico de las parasitosis más frecuentes de los rumiantes. Técnicas de laboratorio e interpretación de resultados*. Buenos Aires: Abad Benjamin.
- Fontenot, D. K., Kinney-Moscona, A., Kaplan, R. M., & Miller, J. (2008). Effects of copper oxide wire particle bolus therapy on trichostrongyle fecal egg counts in exotic artiodactylids. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 39(4), 642-645.

- Fowler, M. E., & Miller, R. E. (2003). Bovidae and Antilocapridae. En S.B. Citino, *Zoo and wild animal medicine* (5ª ed., pp. 669-672). St. Louis: Saunders.
- Gagliardi, F. (2010). *Parámetros parasitarios de la población de Antílopes (Addax nasomaculatus) del Parque Lecocq y elaboración de un plan de control parasitario integrado para la misma* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo.
- Garretson, P. D., Hammond, E. E., Craig, T. M., & Holman, P. J. (2009). Anthelmintic resistant *Haemonchus contortus* in a giraffe (*Giraffa camelopardalis*) in Florida. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 40(1), 131-139.
- George, M. M., Lopez-Soberal, L., Storey, B. E., Howell, S. B., & Kaplan, R. M. (2018). Motility in the L3 stage is a poor phenotype for detecting and measuring resistance to avermectin/milbemycin drugs in gastrointestinal nematodes of livestock. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 8(1), 22-30.
- Geurden, T., Smith, E. R., Vercruyssen, J., Yazwinski, T., Settje, T., & Nielsen, M. K. (2022). World association for the advancement of veterinary parasitology (WAAVP) guideline for the evaluation of the efficacy of anthelmintics in food-producing and companion animals: General guidelines. *Veterinary Parasitology*, 304, 109698.
- Giudici, C., Entrocasso, C., & Steffan, P. (2013). Biología, fisiología e inmunidad de los nematodos gastrointestinales y pulmonares. En *Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva em rumiantes* (pp. 3-28). Montevideo: Hemisferio Sur.
- Goossens, E., Dorny, P., Boomker, J., Vercammen, F., & Vercruyssen, J. (2005). A 12-month survey of the gastro-intestinal helminths of antelopes, gazelles and giraffids kept at two zoos in Belgium. *Veterinary Parasitology*, 127(3-4), 303-312.
- Goossens, E., Vercruyssen, J., Vercammen, F., & Dorny, P. (2006). Evaluation of three strategic parasite control programs in captive wild ruminants. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 37(1), 20-26.
- Holden, T., & Diller, H. (1980). *A field guide to the mammals of Africa, including Madagascar*. Londres: William Collins.
- Hempel, E., Westbury, M. V., Grau, J. H., Trinks, A., Paijmans, J. L., Kliver, S., ... Bibi, F. (2021). Diversity and paleodemography of the Addax (*Addax nasomaculatus*), a saharan antelope on the verge of extinction. *Genes*, 12(8), 1236.

- Hoberg, E. P., Kocan, A. A., & Rickard, L. G. (2001). Gastrointestinal strongyles in wild ruminants. En W. M. Samuel, M. J. Pybus, & A. Alan Kocan P (Eds.), *Parasitic Diseases of Wild Mammals* (2^a ed.). Ames: Iowa State University.
- Isaza, R., Courtney, C. H., & Neal, F. C. (1987). Benzimidazole-resistant *Haemonchus contortus* in roan antelope (*Hippotragus equinus*). *Journal of Zoo Animal Medicine*, 18(2-3), 96-97.
- Isaza, R., Courtney, C. H., & Kollias, G. V. (1990). Survey of parasite control programs used in captive wild ruminants. *Zoo Biology*, 9(5), 385-392.
- Isaza, R., Courtney, C. H., & Kollias, G. V. (1995). The prevalence of benzimidazole-resistant trichostrongyloid nematodes in antelope collections in Florida. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 26(2), 260-264.
- International Union for Conservation of Nature. (2016). *The IUCN red list of threatened species*. Recuperado de <https://www.iucnredlist.org/species/512/50180603>
- International Union for Conservation of Nature-Antelope Specialist Group. (2020). *IUCN mission to Niger for the conservation of the last wild addax and dama gazelles and the Termit and tin Toumma National Nature Reserve: Report and recommendations*. Gland: IUCN.
- Kaplan, R. M., Denwood, M. J., Nielsen, M. K., Thamsborg, S. M., Torgerson, P. R., Gilleard, J. S., ... Levecke, B. (2023). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) guideline for diagnosing anthelmintic resistance using the faecal egg count reduction test in ruminants, horses and swine. *Veterinary Parasitology*, 109936.
- Kirkwood, J. K., Gaskin, C. D., & Markham, J. (1987). Perinatal mortality and season of birth in captive wild ungulates. *The Veterinary Record*, 120(16), 386-390.
- Krausman, P. R., & Casey, A. L. (2007). *Addax nasomaculatus*. *Mammalian Species*, 2007(807), 1-4.
- Lanusse, C., Lifschitz, A., Virkel, G., Alvarez, L., Sanchez, S., Sutra, J. F., ... Alvinerie, M. (1997). Comparative plasma disposition kinetics of ivermectin, moxidectin and doramectin in cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 20(2), 91-99.
- Leathwick, D. M., & Miller, C. M. (2013). Efficacy of oral, injectable and pour-on formulations of moxidectin against gastrointestinal nematodes in cattle in New Zealand. *Veterinary Parasitology*, 191(3-4), 293-300.

- Lifschitz, A., Virkel, G., Ballent, M., Sallovitz, J., & Lanusse, C. (2009). Combined use of ivermectin and triclabendazole in sheep: in vitro and in vivo characterisation of their pharmacological interaction. *The Veterinary Journal*, 182(2), 261-268.
- Lopes, W. D. Z., Felippelli, G., Teixeira, W. F. P., Cruz, B. C., Maciel, W. G., Buzzulini, C., ... Costa, A. J. D. (2014). Resistência de *Haemonchus placei*, *Cooperia punctata* e *Oesophagostomum radiatum* à ivermectina pour-on a 500mcgkg-1 em rebanhos bovinos no Brasil. *Ciência Rural*, 44, 847-853.
- Lorga, A. D., Pereira, L. M. A., Heller, L. M., Bortolato, J. S. D., Compagnoni, I. S., Martinez, A. C., & Sakamoto, C. A. M. (2019). Avaliação endoparasiticida das moléculas Moxidectina e Ivermectina contra nematódeos gastrintestinais de ovinos naturalmente infectados. *Pubvet*, 13, 162.
- Martin, P. J., Anderson, N., & Jarrett, R. G. (1985). Resistance to benzimidazole anthelmintics in field strains of *Ostertagia* and *Nematodirus* in sheep. *Australian Veterinary Journal*, 62(2), 38-43.
- Mazuz, M. L., Alvarez-García, G., King, R., Savisky, I., Shkap, V., Ortega-Mora, L. M., & Gutiérrez-Expósito, D. (2018). Exposure to *Neospora* spp. and *Besnoitia* spp. in wildlife from Israel. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 7(3), 317-321.
- Morales, G., Pino, L. A., Sandoval, E., & G de Moreno, L. (1998). Importancia de los animales acumuladores de parásitos (wormy animals) en rebaños de ovinos y caprinos naturalmente infectados. *Analecta Veterinaria*, 18, 1-6.
- Nalubamba, K. S., & Mudenda, N. B. (2012). Anthelmintic efficacy in captive wild impala antelope (*Aepyceros melampus*) in Lusaka, Zambia. *Veterinary Parasitology*, 186(3-4), 532-537.
- Nowak, R. M. (1991). *Walker's Mammals of the World* (5^a ed.). Baltimore: The Johns Hopkins University Press.
- Prichard, R. (1994). Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, 54(1-3), 259-268.
- Prichard, R., Ménez, C., & Lespine, A. (2012). Moxidectin and the avermectins: consanguinity but not identity. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2, 134-153.
- R Core Team. (2023). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Recuperado de <https://www.R-project.org/>
- Ranjan, S., Trudeau, C., Prichard, R. K., Von Kutzleben, R., & Carrier, D. (1992). Efficacy of moxidectin against naturally acquired nematode infections in cattle. *Veterinary Parasitology*, 41(3-4), 227-231.

- Reason, R. C., & Laird, E. W. (1988). Determinants of dominance in captive female addax (*Addax nasomaculatus*). *Journal of Mammalogy*, 69(2), 375-377.
- Samuel, W. M., Pybus, M. J., & Kocan, A. A. (2001). *Parasitic diseases of wild mammals* (2^a ed.). Ames: Iowa State University.
- Sandoval, E., Morales, G., Jiménez, D., Pino, A., & Márquez, A. (2002). Dinámica del recuento de huevos por gramo de heces de estróngilos digestivos a diferentes horas del día en becerros naturalmente infectados. *Veterinaria Tropical*, 27(1), 51-62.
- Stabach, J. A., Rabeil, T., Turmine, V., Wachter, T., Mueller, T., & Leimgruber, P. (2017). On the brink of extinction—Habitat selection of addax and dorcas gazelle across the Tin Toumma desert, Niger. *Diversity and Distributions*, 23(6), 581-591.
- Swenson, J., Haefele, H. J., & Poppenga, R. H. (2020). Suspected moxidectin toxicosis in a roan antelope (*hippotragus equinus*), a sable antelope (*hippotragus niger*), and an arabian oryx (*oryx leucoryx*) at a semi-free range zoological park. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 51(2), 416-425.
- Taylor, M. A., Hunt, K. R., & Goodyear, K. L. (2002). Anthelmintic resistance detection methods. *Veterinary Parasitology*, 103(3), 183-194.
- Wang, C., Torgerson, P. R., Kaplan, R. M., George, M. M., & Furrer, R. (2018). Modelling anthelmintic resistance by extending egg Counts package to allow individual efficacy. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 8(3), 386-393.
- West, G., Hammond, E. E., & Kukanich, B. (2017). Pilot study: pharmacokinetics of oral and topical moxidectin in the reticulated giraffe (*Giraffa camelopardalis*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 48(2), 536-539.
- Wildt, D., Miller, P., Koepfli, K. P., Pukazhenthi, B., Palfrey, K., Livingston, G., ... Snodgrass, K. (2019). Breeding centers, private ranches, and genomics for creating sustainable wildlife populations. *BioScience*, 69(11), 928-943.
- Zahedi, A., Papparini, A., Jian, F., Robertson, I., & Ryan, U. (2016). Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: critical insights into better drinking water management. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 5(1), 88-109.