



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

CENTRO UNIVERSITARIO UAEM TEMASCALTEPEC

LICENCIATURA DE INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA

Actividad ovicida y larvicida *in vitro* del extracto hidro-alcoholico de *Acacia cochliacantha* en *Haemonchus contortus*

TESIS

PRESENTA:

AGUSTÍN RODRÍGUEZ GÓMEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE INGENIERO
AGRÓNOMO ZOOTECNISTA**

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ROLANDO ROJO RUBIO

ASESOR:

**DR. AGUSTÍN OLMEDO JUÁREZ
DR. JAVIER ARECE GARCIA**



TEMASCALTEPEC DE GONZÁLEZ, MÉXICO; AGOSTO 2016

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	9
II. JUSTIFICACIÓN	11
III. OBJETIVOS	12
2.1. General.....	12
2.2. Específicos	12
IV. HIPÓTESIS	13
V. REVISIÓN LITERARIA.....	14
5.1 Principales nematodos gastrointestinales que atacan a pequeños rumiantes	14
5.1.1 Género <i>Ostertagia</i>	16
5.1.2 Género <i>Teladorsagia</i>	16
5.1.3 Género <i>Trichostrongylus</i>	17
5.1.4 Género <i>Marshallagia</i>	18
5.1.5 Género <i>Cooperia</i>	18
VI. Anatomía y fisiología de los nematodos	19
6.1 Descripción del Nematodo <i>Haemonchus contortus</i>	23
6.1.1 Hospedadores de <i>H. contortus</i>	24
6.1.2 Género <i>H. ssp</i>	24
6.2 Identificación del nematodo <i>Haemonchus contortus</i>	24
6.2.1 Macroscópica	24
6.2.2 Microscópica	24
6.3 Ciclo de vida	25
6.3 Patogenia	26
6.4 Hemoncosis	26
6.4.1 Hemoncosis aguda	26
6.4.2 Hemoncosis sobreaguda	27
6.4.3 Hemoncosis crónica	27
6.5 Signos clínicos.....	27

VII. Diferentes áreas climatológicas donde se presenta el nematodo <i>H. contortus</i>	27
7.1 Hemoncosis en áreas tropicales y subtropicales	27
7.1.2 Hemoncosis en áreas templadas	28
VIII. Diagnóstico	28
8.1 Resistencia y Resiliencia	29
8.1.2 Tratamiento	30
8.2 Control	30
8.2.1 Control químico	31
IX. Alternativas de control contra los nematodos	33
9.1 Control selectivo por la prueba FAMACHA	33
9.2.1 Control mediante hongos hematófagos	35
9.2.2 Rotación de potreros	37
9.2.3 Selección de genética de animales resistentes	38
9.2.4 Control mediante extractos de plantas naturales	39
X. MATERIALES Y MÉTODOS	42
10.1 Zona de estudio	42
10.1.2 Material vegetativo	42
10.2 Material biológico	44
10.2.1 Obtención de las larvas de <i>Haemonchus contortus</i>	44
10.2.2 Desarrollo in vitro de la larva histiotróficas (L₄) de <i>H. contortus</i> ...45	
10.2.3 Obtención de huevos de <i>Haemonchus contortus</i>	46
10.3 Confrontación del extracto hidroalcohólico de <i>Acacia cochliacantha</i> contra huevos y larvas L₃ del nematodo parásito <i>Haemonchus contortus</i> 46	
10.3.1 Evaluación de la inhibición de la eclosión de huevos de <i>Haemonchus contortus</i> bajo condiciones in vitro	46
10.4 Evaluación del porcentaje de mortalidad de larvas L₃ de <i>Haemonchus contortus</i> confrontadas con el extracto hidroalcoholico de <i>Acaccia cochliacantha</i> bajo condiciones in vitro	47
10.5 Variables del experimento	48
10.6 Análisis Estadístico	48
XI. RESULTADOS	49

XII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	53
XIII. BIBLIOGRAFÍA	56

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales NGI localizados dentro del tracto gastrointestinal del rumiante.....	15
Cuadro 2. Principales propiedades de los antihelmínticos más utilizados en ovin.	31
Cuadro 3. Principales propiedades de los antihelmínticos más utilizados en bovinos.....	32
Cuadro 4. Confrontación del extracto hidro-alcohólico de <i>Acacia cochliacantha</i> contra huevos y larvas L ₃ del nematodo parásito <i>Haemonchus contortus</i>	49
Cuadro 5. Concentraciones letales medias (CL ₅₀) y altas (CL ₉₀) del extracto hidro-alcohólico de <i>Acacia cochliacantha</i> , sobre el porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos (IEH) y porcentaje de mortalidad de larvas infectantes L ₃ (MLI) de <i>Haemocus contorus</i>	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Ostertagia circumcincta</i> ; detalle de la bolsa copuladora (M.Cordero1999).....	16
Figura 2. <i>Teladorsagia circumcincta</i> ; extremo posterior del macho (A. Meana 1999).....	17
Figura 3. <i>Trichostrongylus vitrinus</i> : extremo posterior del macho (N. Díez Baños)	17
Figura 4. <i>Marshallagia marshalli</i> : extremo posterior del macho (N. Díez Baños)	18
Figura 5. <i>Cooperia pecctinata</i> : extremo caudal del macho, 100 x (M. cordero)	18
Figura 6. Anatomía de un nematodo macho del género <i>Ascaris</i>	20
Figura 7. Anatomía de un nematodo hembra del género <i>Ascaris</i>	21
Figura 8. <i>Haemonchus contortus</i> : extremo anterior (A. Meana)	23
Figura 9. Ciclo de vida del nematodo parásito <i>Haemonchus contortus</i>	25
Figura 10. Porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos del nematodo parásito <i>Haemonchus contortus</i> contra diferentes concentraciones de extracto hidro-alcohólico de <i>Acacia cochliacantha</i> a las 48h	50
Figura 11. Porcentaje de mortalidad de larvas infectantes L ₃ sin vaina del nematodo parásito <i>Haemonchus contortus</i> contra diferentes concentraciones de extracto hidro-alcohólico de hojas de <i>Acacia cochliacantha</i> a las 24h	50
Figura 12. Determinación de la CL ₅₀ y CL ₉₀ para el extracto hidro-alcohólico de hojas de <i>acacia cochliacantha</i> contra la inhibición de la eclosión huevos del nematodo parásito <i>Haemonchus contortus</i>	51
Figura 13. Determinación de la CL ₅₀ y CL ₉₀ para el extracto hidro-alcohólico de hojas de <i>Acacia cochliacantha</i> contra el porcentaje de mortalidad de larvas infectantes L ₃ sin vaina del nematodo parásito <i>H. contortus</i>	52

RESUMEN

En la actualidad se han comprobado efectos antihelmínticos de extractos acuosos de las leguminosas, por lo que en el presente trabajo de investigación se evaluó el extracto hidro-alcohólico (EHA) de *Acacia cochliacantha*, sobre la inhibición de la eclosión de huevos (IEH) y mortalidad de larvas infectantes L₃ (MLI, %), del nematodo *Haemonchus contortus* como modelo biológico. El diseño experimental utilizado fue un completamente al azar, para probar las siguientes concentraciones 100, 90, 80, 70, 60 y 50; 200, 175, 150, 125 y 100 mg mL⁻¹ para IEH y MLI, respectivamente. Los resultados se analizaron con la prueba de PROBIT del sistema SAS (2006). Las concentraciones letales para IEH fueron: CL₅₀: 66.01 y CL₉₀: 98.23 mg/ml) y las concentraciones letales del porcentaje de mortalidad de larvas infectantes (%MLI) fueron de: (CL₅₀ 127.39 mg/ml y CL₉₀ 177.88 mg/ml) respectivamente. El extracto hidro-alcohólico (EHA) de la leguminosa *Acacia cochlicantha* tiene efectos antihelmínticos en las dos fases exógenas del nematodo *Haemonchus contortus*.

Palabras clave: *Acacia cochlicantha*, *Haemonchus contortus*

I. INTRODUCCIÓN

El uso inapropiado de fármacos químicos ha ocasionado problemas de resistencia por parte de los nemátodos gastrointestinales (NGI) en pequeños rumiantes (Arece *et al.*, 2004; Wolstenholme *et al.*, 2004.). Ante esta situación, se han propuesto estrategias integrales del control de los NGI, dentro de las que se encuentran los estudios relacionados con el uso de plantas con propiedades antiparasitarias debido a la presencia de compuestos secundarios en la sustancia seca (Athanasiadou *et al.*, 2001, 2004; Githiori *et al.*, 2006; Marie-Magdaleine, *et al.*, 2010, Kyriazakis, 2010, Torres Acosta *et al.*, 2012; Olmedo *et al.*, 2014). Tales estudios, han demostrado una mejora en la respuesta de los animales ante las infestaciones parasitarias debido a dos efectos principales: 1) Los metabolitos secundarios de las plantas como los taninos condensados, tienen una acción directa sobre el metabolismo de los parásitos; 2) Los metabolitos secundarios de las plantas pueden actuar de manera sinérgica con el metabolismo de las macromoléculas orgánicas de los alimentos y mejorar su digestión y absorción en el animal. De manera particular, se han realizado estudios *in vitro* en donde se evalúa el efecto de extractos acuosos de plantas naturales sobre las diferentes fases de desarrollo del parásito hasta la mortalidad de los adultos (Marie-Magdeleine, 2009). Las plantas son capaces de elaborar una multitud de moléculas orgánicas (glúcidos, lípidos, sustancias pépticas, saponinas, alcaloides, poli fenoles, terpenos, esteroides, vitaminas y elementos minerales). Todos estos metabolitos mencionados son necesarios para su funcionamiento y relación con el medio externo. Entre ellos, los metabolitos secundarios (saponinas, alcaloides, poli fenoles, terpenos, esteroides, ácidos y aminos no proteicas, glúcidos cianógenos, y otros heterosidos) son como su denominación lo indica: compuestos que no son sensu stricto indispensables para las funciones principales de la planta. Estos metabolitos secundarios son actualmente asociados a la defensa de la planta, denotándose entre las principales funciones: la defensa contra insectos herbívoros, la defensa contra microorganismos (bacterias, hongos y virus), la defensa contra otras plantas en la competencia por los nutrientes y la luz, la

protección contra los efectos nefastos de los rayos ultra violetas, entre otros (Fraenkel, 1969, Wink, 1988). Dentro de los principales metabolitos secundarios a los cuales se le atribuyen efectos antiparasitarios aparecen los taninos condensados (Wolstenholme *et al.*, 2004).

II. JUSTIFICACIÓN

Los sistemas de producción de ovinos basados fundamentalmente en la utilización de los pastos, regularmente presentan problemas de parasitosis ocasionados por los nematodos gastrointestinales, Situación que limita el aprovechamiento eficiente de los recursos nutricionales de los forrajes. El nematodo *H. contortus* es una de las especies de mayor importancia económica, ya que independientemente la mayoría de las situaciones las infestaciones pasan de forma inadvertida, son los responsables de los bajos comportamientos productivos y reproductivos constituyendo en muchas ocasiones una de las causas principales de muerte.

Actualmente, se ha reportado que los métodos tradicionales de control no son lo suficientemente efectivos y se ha demostrado la aparición de resistencia a los fármacos por su mal uso en la dosificación para la prevención y tratamiento de enfermedades parasitarias en ovinos. Es por ello que es necesario buscar alternativas para el control de las parasitosis; dentro de estas alternativas se tienen el uso de plantas con propiedades antihelmínticas.

En las zonas subtropicales de México existen plantas leguminosas con propiedades nutraceuticas dentro de estas se tiene a la *Cubata (Acacia Cochlicantha)*, debido a que ha demostrado ser benéfica en términos de salud (eclosión, desarrollo y migración larvaria de NGI) y producción animal (Olmedo *et al* 2014; Olmedo *et al.*, 2015).

III. OBJETIVOS

2.1. General

Evaluación *in vitro* del extracto hidro-alcohólico de *Acacia Cochliacantha* contra el nematodo parásito *Haemonchus contortus*.

2.2. Específicos

- Evaluar el porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos (%IEH) a diferentes concentraciones.
- Evaluar el porcentaje de mortalidad de larvas infectantes (%MLI) L₃ de *Haemonchus contortus* a diferentes concentraciones.
- Calcular la dosis media y letal máxima en la IEC y MLI.

IV. HIPÓTESIS

El extracto hidro-alcohólico de hojas de la leguminosa cubata (*Acacia Cochliacantha*) tiene actividad ovicida y larvicida contra el nematodo *Haemonchus contortus*.

V. REVISIÓN LITERARIA

5.1 Principales nematodos gastrointestinales que atacan a pequeños rumiantes

Los NGI, son los más frecuentes en los rumiantes de todo el mundo. Principalmente son encontrados bajo sistemas extensivos en las zonas subtropicales, El problema principal que ocasionan son: gastroenteritis parasitarias, procesos generalmente endémicos, de curso crónico, morbilidad y en algunos casos mortalidad. En la mayoría de las veces producidos por varias especies que se localizan en las diferentes partes del tracto gastrointestinal (A. Meana Mañes y F. A Rojo Vázquez, 1999).

Las nematodosis se caracterizan por alteraciones digestivas, retraso del crecimiento, disminución de los parámetros productivos y reproductivos, en ocasiones también ocasionan anemia y en casos más severos causan la muerte del animal. La intensidad de infestación es variante y depende de múltiples factores (edad de los animales, clima, sistemas de producción, humedad relativa), (A. Meana Mañes y F. A Rojo Vázquez, 1999).

Los nematodos gastrointestinales de los rumiantes pertenecen a diversas familias y géneros, destacando los siguientes: Trichostrongylidae (*Haemonchus contortus*, *Ostertagia teladorsagia*), las especies de este género se incluían en el género *Ostertagia*, *Trichostrongylus*, *Marshallagia (cooperia)*; Molineidae (*Nematodirus*); Ancylostomatidae (*Bunostomum*) y Strongylidae (*Chabertia* y *Oesophagostomum*). Generalmente las infecciones son mixtas, participando dos o más géneros y varias especies, lo que explica la denominación general de *gastroenteritis* aunque son más frecuentes los *tricostrongilidos*.

Cuadro 1. Principales NGI localizados dentro del tracto gastrointestinal del rumiante

Hospedador	Abomaso	Intestino
Bovino	<i>Ostertagia ostertagi</i>	<i>Cooperia oncophora</i> <i>Cooperia punctata</i> <i>Nematodirus helvetianus</i>
Ovino/Caprino	<i>T. circumcincta</i> <i>T. trifurcata</i> <i>H. contortus</i> <i>T. axei</i>	<i>T. columbriformis</i> <i>T. vitinus</i> <i>T. capricola</i> <i>N. filicollis</i> <i>N. spathiger</i> <i>N. battus</i> <i>Marshallagia marshallagia</i> <i>Cooperia curtecei</i>

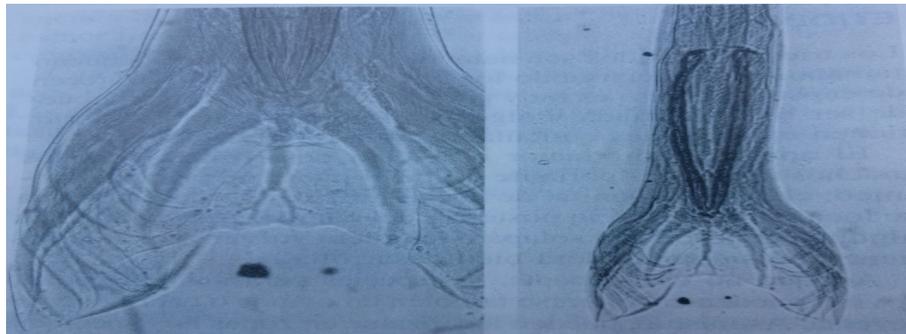
A. Meana Mañes y F. A. Rojo Vázquez, 1999.

La especie más importante es *Haemonchus Contortus* que se localiza en el abomaso, los machos llegan a medir entre 19-22 mm y las hembras entre 25-34 mm. Son hematófagos y tienen color rojo debido a la sangre ingerida, el aparato genital es de color rojo, en la cavidad bucal tienen una lanceta dorsal con la que erosionan la mucosa gástrica, su cutícula es lisa y provista de papilas cervicales prominentes. El macho posee una bolsa copuladora muy desarrollada, caracterizada por la asimetría del lóbulo dorsal. La hembra tiene una solapa bulbar muy prominente y de interés morfológico.

5.1.1 Género *Ostertagia*

Las especies de este género se localizan en el cuajar, tienen color pardo por la sangre a medio digerir que se encuentra en su intestino. El tamaño de los machos es de 7-9 mm y el de las hembras es de 10-12mm. La bolsa copuladora está formada por lóbulos laterales y dorsales y otro accesorio dorsal situado simétricamente a los laterales. Las hembras poseen normalmente, la vulva protegida de una lengüeta o solapa muy fina. La especie más importante es *Ostertagia ostertagia*, del ganado vacuno, aunque en ocasiones puede encontrarse en la oveja. Las espículas del macho terminan en tres procesos en forma de ganado (A. Meana Mañes. Rojo Vásquez 1999).

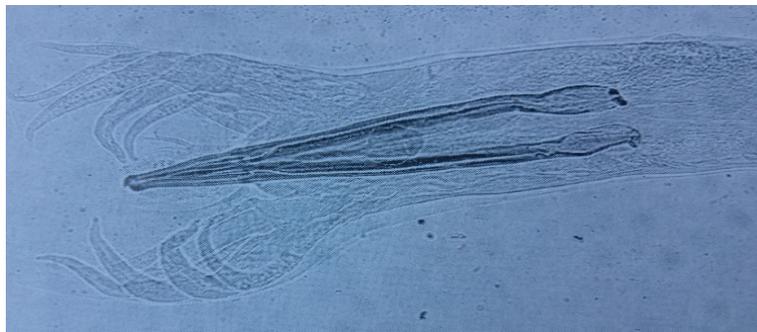
Figura 1. *Ostertagia circumcincta*; detalle de la bolsa copuladora (M.Cordero1999)



5.1.2 Género *Teladorsagia*

Teladorsagia circumcincta es la especie más frecuente en todo el mundo, Se localiza en el cuajar del ganado ovino y caprino. Las espículas terminan en un abultamiento grande y en un proceso pequeño y agudo. *Teladorsagia trifurcata* es un polimorfismo de la especie anterior, concretamente la forma anterior <<menor>> (tamaño más pequeño, menor desarrollo de las espículas, etc.), (A. Meana Mañes. Rojo Vásquez 1999).

Figura 2. *Teladorsagia circumcincta*; extremo posterior del macho (A. Meana 1999)



5.1.3 Género *Trichostrongylus*

En este género incluye parásitos en el cuajar e intestino delgado. Son vermes pequeños (5-8mm), muy finos y de color pardo rojizo, los machos tienen las espículas cortas, robustas y retorcidas. Las especies más frecuentes son: *Trichostrongylus axei* es la única especie presente en el cuajar y la de menor tamaño, se ha encontrado también en el estómago del cerdo, equinos y hombre. *Trichostrongylus colubriformis* vive en el intestino delgado y, a veces en el cuajar de rumiantes, pero también en conejos, cerdo, perro y hombre. *Trichostrongylus vitrinus* se encuentran en el intestino delgado de pequeños rumiantes y en ocasiones en el conejo, cerdo y hombre. *Trichostrongylus capricola*, este parásito se encuentra en el intestino delgado de cabras y menos frecuente en ovejas, (A. Meana Mañes. Rojo Vásquez 1999).

Figura 3. *Trichostrongylus vitrinus*: extremo posterior del macho (N. Díez Baños)

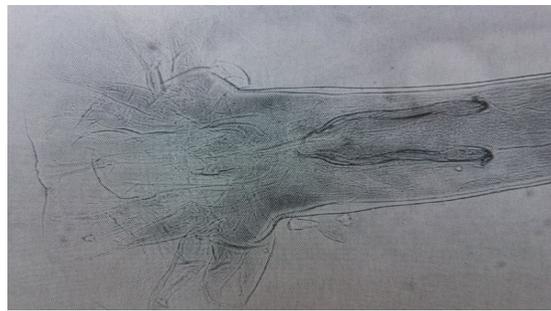


5.1.4 Género *Marshallagia*

La especie *Marshallagia* es propia de los ovinos y caprinos de áreas mediterráneas, es similar a *ostertagia ssp*, pero se diferencia por su mayor tamaño (hasta 2 cm).

Las espículas son delgadas y sin expansiones terminales. (A. Meana Mañes. Rojo Vásquez 1999).

Figura 4. *Marshallagia marshalli*: extremo posterior del macho (N. Díez Baños)

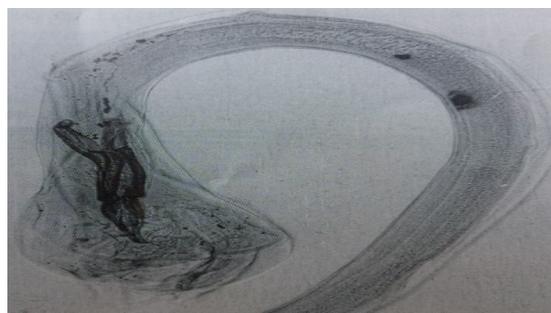


5.1.5 Género *Cooperia*

Las *cooperias ssp*, se encuentran en el intestino delgado y son menor frecuencia en el cuajar, son relativamente pequeñas, de color rojizo y en el extremo anterior tienen una vesícula cefálica, muy característica. La cutícula presenta estrías transversales muy manifiestas en la región esofágica. Las especies más frecuentes son: *Cooperia ancophora* se presenta principalmente en ganado bovino.

Cooperia punctata se presenta en el ganado bocino y con menos frecuencia en el ganado ovino. *Cooperia curticei* es la especie de mayor interés en ganado ovino y caprino. (A. Meana Mañes y Rojo Vásquez 1999).

Figura 5. *Cooperia pectinata*: extremo caudal del macho, 100 x (M. cordero)



VI. Anatomía y fisiología de los nematodos

Los miembros de este grupo reciben el nombre de gusanos redondos o nematelmintos, son animales pequeños (muchas de estas especies miden entre 1 mm y 5 cm), son delgados, cilíndricos, no segmentados, y aunque se encuentran recubiertos por una cutícula proteica densa, suelen ser transparentes. Constituyen el grupo más importante de invertebrados pseudocelomados (hay unas 20.000 especies descritas), se encuentra en muchos ecosistemas, y el filo incluye a especies de vida libre y especies parasitas.

Las formas parasitas son siempre endoparásitos, suelen poseer unas expansiones cuticulares laterales y aplanadas denominadas alas, un ciclo epidemiológico vital directo o con un hospedador intermediario, e infectan tanto a animales (zoo parásitos) como a vegetales (fito parásitos); casi todos los vertebrados pueden ser hospedadores de estos parásitos. En el extremo cefálico presentan un par de depresiones denominadas afidios que actúan como quimiorreceptores; así mismo, muchas especies tienen en su extremo posterior unos órganos semejantes a los afidios que reciben el nombre de fasmidios. (Padilla Álvarez, F. A. Cuesta, Antonio E, Cuesta López en zoología aplicada, pagina 37-45).

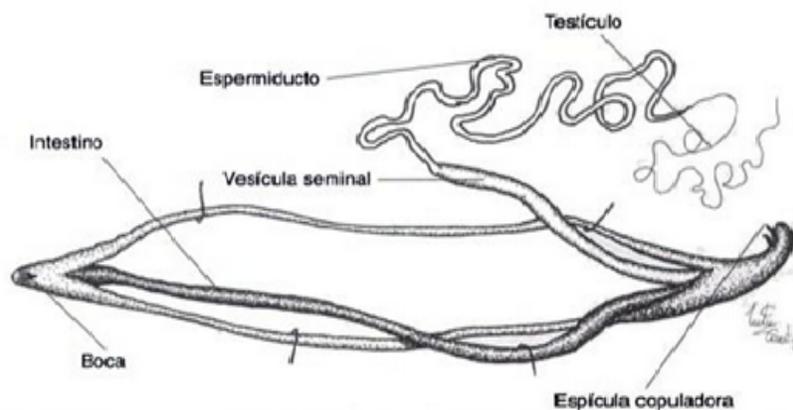
Los nematodos carecen de una segmentación y de silos (excepto en los órganos sensitivos); debido a su falta de músculos circulares y a la existencia de abundantes músculos longitudinales; se mueven generalmente curvándose y retorciéndose, pero nunca avanza con un movimiento de extensión y contracción, como la hacen los gusanos segmentados. Poseen un tubo digestivo completo; presentan alrededor de la boca papilas, labios o cerdas sensoriales, que son estructuras adaptadas a su forma de vida, estas especies de vida libre son generalmente depredadores activos que tienen dientes, y los parásitos intestinales presentan estructuras bucales especializadas (ej. Ganchos), que les permiten la fijación y posteriormente la penetración en la pared intestinal de su hospedador.

(Padilla Álvarez, F. A. Cuesta, Antonio E, Cuesta López en zoología aplicada, pagina 37-45).

Los nematodos se dividen en dos clases. La clase Adenofóridos o Afasmídios, así denominados por carecer de fasmidios, que son unas bolsas sensoriales pequeñas (quimiorreceptores), situadas cerca del extremo posterior de los animales. La otra clase recibe el nombre de Secernétidos o Fasmidios, todas las especies de esta clase poseen fasmidios. Los extremos de estos animales se encuentran normalmente aguzados y en ellos se sitúan, respectivamente, la boca y el ano (el ano suele tener una posición ventral y el cuerpo se continua generalmente en una cola). Muchas especies de vida libre presentan en su extremo posterior un poro de las glándulas caudales; estas glándulas son parecidas a las glándulas adhesivas que poseen los gástricos y rotíferos.

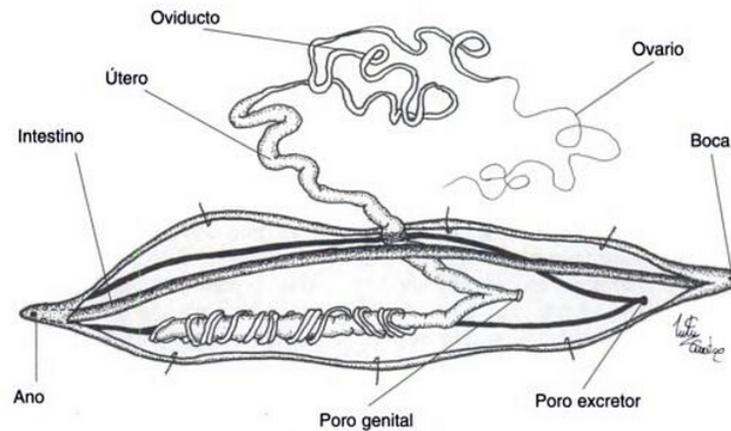
La pared corporal presenta externamente una compleja cutícula que consta de tres capas: la exterior es de un material semejante a la queratina (córtez), la central es una red de fibras esponjosas, que puede presentar en su interior sistemas de soporte (ej. Varillas esqueléticas), y la interior se encuentra constituida por fibras colágenas.

Figura 6. Anatomía de un nematodo macho del género *Ascaris*



Borchert, A. (1981).

Figura 7. Anatomía de un nematodo hembra del género *Ascaris*



Borchert, A. (1981).

Exteriormente la cutícula puede ser lisa o llevar cerdas, escamas o papilas. Una membrana basal separa la cutícula de la epidermis (hipodermis), de la que produce; la hipodermis presenta una estructura celular o sincitial, esta engrosada en su parte interna formando cuatro cordones, en donde se sitúan los núcleos celulares en los animales de menor tamaño y que reciben el nombre de cordones hipodérmicos. Los cordones dorsal y ventral (situado uno en el dorso y el otro en la zona ventral) presentan en su interior cordones nerviosos, y los cordones laterales portan los conductos excretores.

Los cordones dorsal y ventral (situado uno en el dorso y el otro en la zona ventral) presentan en su interior cordones nerviosos, y los cordones laterales portan los conductos excretores. La cavidad corporal (recibe el nombre de pseudocoeloma al no estar recubierta por una membrana) no presenta células libres, se encuentra rellena de un líquido relativamente de alta presión hidrostática (la presión del pseudocoeloma de los nematodos es la más alta encontrada en un animal) que baña

los órganos internos y que funciona como un esqueleto (Padilla Álvarez, F. A. Cuesta, Antonio E, Cuesta López en zoología aplicada, pagina 37-45).

El aparato digestivo comienza en la boca, alrededor de esta pueden existir órganos accesorios, tales como mandíbulas o dientes (formados por la cutícula). La boca de paso a una cavidad oral o estoma que se continua con una faringe muscular bien desarrollada; posteriormente hay un intestino que en algunas especies puede presentar ciegos intestinales anteriores, un corto recto y finalizar en una cloaca en los machos (suele modificarse para formar órganos copuladores) y en un ano en las hembras.

La comida pasa por el tubo digestivo, gracias principalmente a los movimientos corporales; las glándulas faríngeas y el epitelio del intestino son los encargados de secretar los enzimas digestivos. El aparato excretor es bastante peculiar: carecen de protonefridios y está constituido, en muchos casos, por una o más células glandulares grandes que se abren en un poro excretor, situado ventralmente en la porción anterior del cuerpo animal, o bien poseen células y canales. La pared corporal es la encargada de regular el contenido hídrico y el transporte de iones.

El principal deshecho (metabólico) nitrogenado producido es amoníaco, que se excreta por la pared corporal y por el tubo digestivo; también puede excretar urea. En el aparato reproductor, las gónadas con forma tubular en las especies parasitas suelen ser largas y enrolladas, pueden ser dobles o únicas y se localizan en el pseudocele. El testículo (la mayoría de los machos suelen tener uno) desemboca por el espermiducto o vaso deferente en la cloaca (algunas especies poseen vesículas seminales y todas tienen glándulas prostáticas en la zona de conexión con el intestino (los espermatozoides son ameboides y no flagelados).

Los óvulos salen del ovario (suelen ser dos, uno anterior y otro posterior) gracias a los oviductos y desembocan en los úteros (hay dos, pueden tener receptáculos seminales y en ellos ocurre la fecundación); éstos se continúan con una vagina

hasta desembocar en un gonoporo medio ventral (vulva), situado en la región posterior del cuerpo.

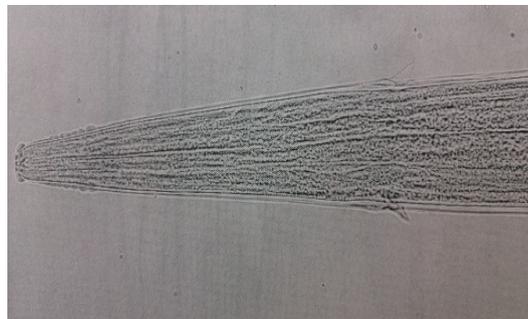
La fecundación es interna, y en muchas especies los machos poseen junto al ano espículas copuladoras. El sistema nervioso está formado por un anillo constituido principalmente por fibras, que se encuentra asociado a varios ganglios y se localiza en torno a la faringe (o esófago); también existe un cordón nervioso dorsal y otro ventral así como cordones epidérmicos laterales. (Padilla Álvarez, F. A. Cuesta, Antonio E, Cuesta López en zoología aplicada, pagina 37-45).

Tanto en el anillo como en los cordones hay ganglios, desde ellos parten nervios que inervan los diferentes receptores y sistemas corporales. Presentan papilas sensoriales situadas alrededor de la cabeza y de la cola; setas sensoriales (silos) que son mecano receptores. Los miembros de la clase Afidios tienen órganos sensoriales, de los que la clase recibe el nombre. Carecen del aparato circulatorio y respiratorio, aunque algunas de las especies parásitas poseen hemoglobina en el líquido peri visceral. Muchas especies tienen una gran plasticidad metabólica y pueden vivir tanto en condiciones de aerobiosis como de anaerobiosis.

6.1 Descripción del Nematodo *Haemonchus contortus*

El nematodo parásito *Haemonchus contortus* se localiza en el abomaso y se alimenta principalmente de sangre, por lo que causa grandes pérdidas en la ganadería ovina y vacuna, principalmente en áreas tropicales sub tropicales.

Figura 8. *Haemonchus contortus*: extremo anterior (A. Meana)



6.1.1 Hospedadores de *H. contortus*

- Ganado bovino
- Ganado ovino
- Ganado caprino

6.1.2 Género *H. ssp*

1. *Haemonchus contortus*
2. *H. placei*
3. *H. similis*

Para la especie de ovinos y caprinos se le denomina *Haemonchus contortus* y para la especie de bovinos se le denomina *Haemonchus placei*, este se localiza en el abomaso de bovinos y otros rumiantes, también se le ha encontrado en ovinos. Las características morfológicas son semejantes al anterior (place, 1893). Estas especies están distribuidos a nivel mundial, con una gran importancia en áreas tropicales y subtropicales.

6.2 Identificación del nematodo *Haemonchus contortus*

6.2.1 Macroscópica

Los nematodos de *Haemonchus contortus* adultos resultan muy fácilmente identificables por su localización en el abomaso y su gran tamaño (2,0-3,0 cm). En especímenes frescos, en las hembras los ovarios son blancos enrollados en forma de espiral alrededor del intestino repleto de sangre le dan un aspecto rayado.

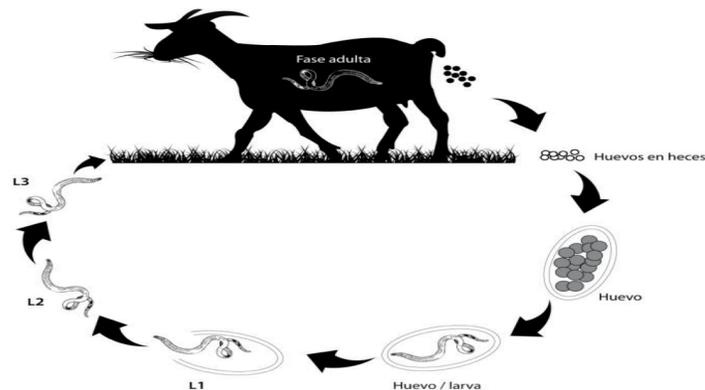
6.2.2 Microscópica

La bolsa copuladora de los machos tiene un lóbulo dorsal asimétrico y las espículas terminan en forma de espolón; en las hembras normalmente la vulva está recubierta por la solapa bulbar. En ambos sexos existen papilas cervicales y una pequeña lanceta o diente en el interior de la capsula.

6.3 Ciclo de vida

La mayoría de los NGI tienen ciclo biológico directo, y su fase infectante es la larva o tercer estadio (L₃) (Cuellar, 2006).

Figura 9. Ciclo de vida del nematodo parásito *Haemonchus contortus*



Dentro del ciclo de vida de *Haemonchus contortus* comprende de dos fases; A) exógena, no parásita desde huevo hasta L₃ y B) endógena o parásita, desde la ingestión de la L₃ hasta el desarrollo de los parásitos adultos, la cópula y la producción de huevos. El desarrollo de la fase exógena, ocurre en el pasto, y puede durar de 4 a 8 días, dependiendo de las condiciones de humedad y temperatura (Barriga, 2002; Cuellar, 2006; Bowman *et al.*, 2011).

Esta fase comprende la eliminación de los huevos por las heces, evoluciona al primer estadio larvario L₁ y seguir hasta transformarse en L₃ (Barriga, 2002). A partir de la L₁ y L₂ éstas emergen y se alimentan de bacterias y detritus de las heces, para después transformarse en L₃ que se encuentra cubierta por la cutícula desprendida de la L₂ por lo tanto la larva L₃ no puede alimentarse y depende de las

reservas energéticas para su sobrevivencia (Barriga, 2002; Cuellar, 2006; Bowman *et al.*, 2011).

6.3 Patogenia

La patogenia de *H. contortus* consiste en una anemia hemorrágica aguda causada por los hábitos hematófagos de los parásitos. Por cada verme se pierden unos 0.05 ml de sangre al día. Tanto por lo que ingiere el parásito como por lo que se pierde al sangrar la herida, de modo que una oveja con 5000 ejemplares de *H. contortus* puede perder alrededor de 250 ml de sangre al día.

6.4 Hemoncosis

La hemoncosis se adquiere por la ingestión de larvas estadio L₃, junto con el pasto penetra en las glándulas abomasales donde muda a L₄, la hemoncosis repercute negativamente en la eficiencia biológica y económica de los rebaños ovinos en los que produce retrasos en el crecimiento, desnutrición, baja conversión alimenticia, anemia, pérdida de apetito, bajos índices productivos y reproductivos y en algunos casos muertes en animales jóvenes (Quiroz, 1984; Notter *et al.*, 2003).

6.4.1 Hemoncosis aguda

Se caracteriza por una anemia aparente a las dos semanas post-infección y se caracteriza por la progresiva y marcada caída del valor hematocrito. Sin embargo debido a la continua pérdida de hierro y de proteínas en el interior del tracto gastrointestinal y a la anorexia de la médula vuelve a agotarse y se producen nuevos descensos del hematocrito antes de la muerte. Cuando las madres están afectadas, la agalaxia puede causar la muerte en los corderos lactantes.

6.4.2 Hemoncosis sobreaguda

Esta forma se produce en infecciones masivas más de 30,000 individuos; las ovejas aparentemente sanas pueden morir por una gastritis hemorrágica grave.

6.4.3 Hemoncosis crónica

En esta etapa se desarrolla durante una estación seca prolongada, en la que la reinfección no tiene importancia, pero el pasto es muy deficiente en nutrientes.

La presencia permanente de varios centenares de parásitos ocasiona una pérdida de sangre suficiente para provocar pérdida de peso, debilidad, depravación del apetito y una ligera anemia.

6.5 Signos clínicos

En los casos hiper-agudos, la mayoría de los ovinos y caprinos llegan a morir súbitamente por la gastritis hemorrágica, la hemoncosis aguda se caracteriza por anemia, grados variables de edema, del que la forma mandibular y la ascitis son las más fácilmente reconocibles, letargia, heces oscuras y caída de lana. No se suele presentar diarrea. La hemoncosis crónica está asociada con pérdida progresiva de peso y debilidad, no suele haber anemia ni edemas manifiestos.

VII. Diferentes áreas climatológicas donde se presenta el nematodo *H. contortus*

7.1 Hemoncosis en áreas tropicales y subtropicales

El desarrollo larvario óptimo de *H. contortus* se produce a temperaturas relativamente elevadas, por lo que es una enfermedad fundamental en el ganado

ovino en climas cálidos. La humedad que se mantiene en el interior de las heces y la vegetación es también esencial para la supervivencia de las larvas y su desarrollo, por lo que la frecuencia y gravedad de los brotes de la enfermedad están muy ligados a las lluvias en una zona concreta. Dadas estas condiciones climáticas, la aparición repentina de los nematodos depende de dos factores; primero: la elevada presencia de huevos en las heces, incluso en infestaciones moderadas, puede hacer que se desarrollen rápidamente grandes poblaciones de L3 en el pasto.

En algunas áreas tropicales y subtropicales como Australia, Brasil, Medio Oriente y Nigeria, la supervivencia de los parásitos esta también asociada con la capacidad hipobiosis de las larvas de *H. contortus*. La supervivencia de *H. contortus* en los pastos tropicales es variable, depende del clima y la cantidad de áreas sombreadas pero las larvas infectantes son bastante resistentes a la desecación y algunas pueden sobrevivir durante 1-3 meses en pasto o en las heces.

7.1.2 Hemoncosis en áreas templadas

La información disponible señala que las infecciones se desarrollan en dos sentidos. Posiblemente, el más común es el ciclo sencillo anual. Las larvas infectantes que se han desarrollado de los huevos depositados por los ovinos en la primavera son ingeridas por las ovejas y los corderos al principio del verano. La mayoría de ellas se inhiben en el abomaso como L4 y no completan su desarrollo has la primavera siguiente, los signos clínicos de este nematodo se producen durante el periodo de maduración de las larvas hipo bióticas y en las ovejas suelen coincidir con los partos.

VIII. Diagnóstico

Los síntomas son muchas veces suficientes para el diagnóstico del síndrome agudo, especialmente si se complementa con el recuento de huevo en heces. La necropsia, presentando atención a las alteraciones en el abomaso y en la medula de los huesos lagos, es también útil. Las alteraciones son evidentes aunque en ovejas que acaban de auto curarse (verde bajo) o están en fase terminal de la enfermedad, la mayor parte de los parásitos pueden haber desaparecido del abomaso.

En la hemoncosis sobreaguda puede estar alterado solo el abomaso, ya que la muerte sucede tan súbitamente que los cambios medulares son mínimos. El diagnóstico de la hemoncosis crónica es más difícil porque se puede confundir con una nutrición deficiente; la confirmación se realiza por la desaparición gradual del síndrome tras el tratamiento antihelmíntico.

8.1 Resistencia y Resiliencia

El término de resistencia a nematodos ha sido definido como la habilidad de un hospedero para iniciar y mantener una respuesta que evite o reduzca el crecimiento de los parásitos o elimine la carga parasitaria (Hooda *et al.*, 1999). Los animales resistentes no son completamente refractorios a la enfermedad solo que albergan menos parásitos que los animales susceptibles y por lo tanto eliminan menos huevos en las heces. Esta resistencia tiene su base en la capacidad inmunológica de cada individuo para responder a la parasitosis (Gill, 2007).

La resiliencia es la habilidad que tiene un animal de compensar los efectos negativos del parasitismo, lo cual se refleja en el mantenimiento de los parámetros productivos y reproductivos (Paolini *et al.*, 2005), los ovinos presentan generalmente en forma simultánea alta resiliencia a la hemoncosis. Algunas razas presentan una moderada o baja resistencia con relativamente alta resiliencia, lo

cual les permite comportarse productivamente a la par de las que son relativamente resistentes (Alba-Hurtado *et al.*, 2010).

8.1.2 Tratamiento

Los ovinos y caprinos pueden ser tratados con benzimidazoles, levamisol, ivermectina, milbemicina o salicilanilida y inmediatamente se las debe de trasladar a praderas en las que no se hayan pastado recientemente. Cuando se retornan al pasto original se deben de adoptar medidas profilácticas ya que muchas larvas pueden haber sobrevivido para reiniciar un nuevo ciclo. El nuevo pasto debe de tener un buen valor nutritivo; alternativamente se puede administrar algún complemento alimenticio.

8.2 Control

En los trópicos y subtrópicos el control depende de la duración y del número de periodos en que las lluvias y la temperatura permiten el desarrollo de altos niveles de larvas de *H. contortus* en el pasto. En estos periodos puede resultar necesario el uso de un antihelmíntico a intervalos de 2-4 semanas, dependiendo del grado de riesgo.

Las ovejas pueden ser tratadas al menos una vez al inicio de la estación seca y preferentemente también antes del comienzo de las lluvias para impedir que las larvas hipo bióticas puedan suponer una futura amenaza, para estos casos se recomienda usar uno de los modernos benzimidazoles o una ivermectina/milbemicina.

En áreas templadas, las medidas indicadas para el control de las gastroenteritis parasitarias en ovejas suelen ser suficientes para prevenir brotes de hemoncosis. En la actualidad se están realizando pruebas para determinar la eficacia de una

vacuna recombinante basada en una glucoproteína de las microvellosidades intestinales de los estadios de *H. contortus* para su control.

8.2.1 Control químico

El control y la profilaxis de los tricostrongilidos se deben contemplar un conjunto de acciones que combinen los tratamientos antihelmínticos estratégicos con prácticas de pastoreo que limiten los riesgos de infección.

Cuadro 2. Principales propiedades de los antihelmínticos más utilizados en ovinos

Grupo y nombre	Dosis Mg/kg	Vía de administración	Actividad		P. supresión	
			L	Lhp	Leche	carne
Benzimidazoles						
Tiabendazol	44.0	Oral	+	+	0	0
Albendazol	5.0	Oral	+	+	3	14
Febendazol	5.0	Oral	+	+	3	14
Oxfendazol	5.0	Oral	+	+	5	14
Febantel	6.0	Oral	+		2	7
Tiofanato	50.0	Oral	+		3	7
Netobimín	7.5	Oral	-		4	10
Imidazotiazoles						
Levamisol	45.0	Oral	+		2	7
Lactonas macro cíclicas						
Ivermectina	0.2	Oral	+		NA	21
Moxidectina			+			
Doramectina				Parenteral		

(A. Meana Mañes y Rojo Vásquez 1999, en parasitología veterinaria pag 237-252)

La utilización masiva y reiterada de antihelmínticos ha favorecido el desarrollo de cepas resistentes a ellos, que complican el control de los tricostrongilidosis, sobre todo en los ovinos. Está muy relacionada con la utilización de los benzimidazoles y otros grupos farmacológicos más antiguos, como la fenotiacina o los imidazotiazoles, (A. Meana Mañes y Rojo Vásquez 1999, en parasitología veterinaria pagina 237-252). También son importantes, la administración frecuente, el uso repetido del mismo fármaco o grupos de antihelmínticos, y la administración de dosis subterapéuticas.

Cuadro 3. Principales propiedades de los antihelmínticos más utilizados en bovinos

Grupo y nombre	Dosis mg/kg	Vía de administración	Actividad		p. supresión	
			L	Lhp	leche	carne
Benzimidazoles						
Tiabenzasol	25.0	Oral	+	+	0	0
Albendazol	7.5	Oral	+		3	14
Febendazol	7.5	Oral	+	+	3	14
Oxfendazol	5.0	Oral	+	+	5	5
Probenzimidazoles						
Febantel	7.5	Oral	+	+	2	8
Tiofanato	50.0	Oral	+	+	3	7
Netobimín	7.5	Oral	+	+	4	10
Imidazotiazoles						
Levamisol	45.0	Oral	+	+	1/2	
			-		3/7	
			Pour-on intram subcut			
Morantel	10.0	Bolo	+	+	0	0
Lactonas macrocíclicas						
Ivermectina	0.2	Subcutánea	+	+	NA	21
Moxidectina			+			
Doramectina						

(A. Meana Mañes y Rojo Vásquez 1999, en parasitología veterinaria pag 237-252)

IX. Alternativas de control contra los nematodos

9.1 Control selectivo por la prueba FAMACHA

La técnica de **FAMACHA** (Malan Chart) ha sido desarrollada originalmente en Suda-frica, para el control de *H. contortus* en ovinos (Barger *et al.*, 1994), en la actualidad se está validando en Brasil, Paraguay, Uruguay y se prosiguen los estudios en Sud-frica (Bath, 2000a; Bath, 2000b; Vatta *et al.*, 2002). Desde hace dos décadas atrás se determinó que la capacidad de desarrollar una fuerte respuesta inmune en *H. contortus* no siempre resulta en la habilidad de sobre llevar los efectos asociados con la infección.

Dentro un rodeo o majada existe una proporción de individuos completamente susceptibles mientras que otros muestran distintos grados de resistencia o tolerancia a los nematodos. La utilización de modelos matemáticos permitió desarrollar la hipótesis de que la resistencia antihelmíntica puede ser dilatada en el tiempo, tratando solo aquellos animales afectados severamente por los nematodos (Barger, 1985).

En este caso el refugio de la población sin tratar (larvas en la pradera aportada por los animales no tratados) será el encargado de "diluir" las poblaciones de los nematodos resistentes. Sobre este principio fue desarrollada la técnica de **FAMACHA**, que visualiza los distintos niveles de anemia producida por *H. contortus* a través de la coloración ocular de los ovinos. (Van Wky *et al.*, 1997). Como **FAMACHA** solo detecta anemia, como una manifestación del efecto de *Haemonchus contortus* es una medida de resiliencia que de resistencia (Bisset, 2000a).

Para llevar a cabo esta técnica se necesita de personal capacitado para establecer el ámbito de la población de ovinos/cabras con base a los distintos grados de coloración de la mucosa ocular de acuerdo a una escala preestablecida (Schillhorn van Veen, 1997; Vial *et al.*, 1999; Sangster y Gill, 1999; van Veen, 1999; Nari y Hansen, 1999). Esta escala se ha desarrollado de acuerdo a estudios de correlación entre el hematocrito y la coloración de la mucosa (Malan *et al.*, 2000).

Previo a su aplicación, es necesario realizar una prueba de reducción del recuento de huevos para determinar la presencia y/o magnitud del fenómeno de resistencia. Una de las ventajas que tiene la prueba **FAMACHA** es la gran flexibilidad para utilizarla, en casi cualquier sistema de producción ovina-caprina, disminuyendo el costo por concepto de antihelmínticos. Asimismo, permite la disminución de la presión de la selección para el desarrollo de poblaciones de nematodos resistentes a los antihelmínticos.

Para descartar aquellos animales que repiten la dosis, de manera económica, utilizándolo en establecimientos de muy pocos recursos y/o con el personal de mínimo nivel de educación (fácilmente realizable). Las desventajas que tiene esta técnica es la posibilidad de hacer o realizar un diagnóstico erróneo, (principalmente en áreas donde la fasciola hepática y *T. colubriformis* son un problema). La FAMACHA es una técnica fácilmente de realizar pero difícilmente entendible (en su fundamento) por el productor. Lo cual esto ha llevado actitudes implícitas, pensando que la tecnología es la solución para cualquier problema parasitario.

Se han observado varias respuestas no consistentes en algunas categorías en (corderos muy jóvenes y en ovejas recién paridas) o en situaciones de desnutrición (Bath 2000b). Aumenta el trabajo, lo que puede ser un gran problema en grandes establecimientos que cada vez tiene menos personal. Cuando las condiciones epidemiológicas favorecen fuertemente al parasito, la frecuencia de tratamientos aumenta, así como la necesidad de incrementar las inspecciones en

el establecimiento por riesgo de aumentar pérdidas productivas/muertes de animales).

Las consecuencias epidemiológicas de la FAMACHA es que disminuye la presión antihelmíntica sobre el total de los parásitos, permitiendo aumentar gradualmente la proporción de animales resistentes/resilientes, si se incluye un plan de selección/refugio de los animales evaluados, combinando con otras estrategias de control que se puede combinar de forma diferida con cualquier otra estrategia de manejo, por ejemplo el pastoreo rotativo luego de un pastoreo diferido para el control de *H. contortus*.

9.2.1 Control mediante hongos hematófagos

Otras de las formas de controlar a los nematodos gastrointestinales es mediante el uso de hongos, existen más de 200 especies en todo el mundo denominados como hongos hematófagos por ser capaces de utilizar nematodos como fuente de nutrientes (Barrón, 1997). De todas las especies que existen de hongos se tiene más importancia sobre los hongos predadores, los cuales han desarrollado órganos especializados para atrapar a las larvas en movimiento.

En términos práctico, para una especie de hongo hematófago pueda ser utilizada como un agente biológico de control, este tiene que ser capaz de pasar por el tracto gastrointestinal de los rumiantes sin ser destruido y luego en el ambiente de germinar, crecer, atrapar y destruir nematodos en las heces. De lo que cabe los mayores esfuerzos de investigación han sido puestos en *Duddingtonia flagrans*, es una especie de amplia distribución mundial, cuyas esporas han demostrado tener capacidad superior para atravesar el tracto gastrointestinal (Larsen *et al.*, 1992; Mendoza de Gives *et al.*, 2010).

Destinado a combatir los estados libres de nematodos que se encuentran en la materia fecal de los ovinos, caprinos, equinos y cerdos (Larsen, 1999; Mendoza de Gives *et al.*, 2010). La utilización estratégicas de clamidosporas de *D. flagrans* en

el alimento, luego el pasaje por el tracto gastrointestinal, esto produce una red de aspecto tridimensional, que atrapan a las larvas y las destruyen. Se estima que la aplicación correcta de este tipo de tecnología no producirá una eliminación total de la población larvaria, pero permite un gradual aumento de la inmunidad con una menor dependencia de los antihelmínticos (Barnes *et al.*, 1995).

Uno de las limitaciones que tiene esta estrategia de control es que se tenga una producción y disponibilidad en gran cantidad de clamidiosporas, con un vehículo, apropiado y para su administración en condiciones de campo, a través de la suplementación, la utilización de bloques minerales y en el futuro, de la utilización de capsulas intra-ruminales con la liberación controlada de clamidiosporas (Waller, 1997). En los sistemas de producción extensivos, es necesario contar con un mejor conocimiento de la epidemiología parasitaria, para determinar los momentos de mayor disponibilidad larvaria es necesario realizar las aplicaciones y uso de los hongos nematofagos.

Una de las principales ventajas que esta técnica tiene es que una vez que se dispones del material biológico conocido. Su producción es relativamente económica, disminuye la dependencia en el uso de antihelmínticos. Sin embargo actualmente no existe un producto estándar disponible. No obstante, existe interés comercial sobre su uso (Gillespie, 2002).

Asimismo, otras de las limitantes que se debe de tomar en cuenta es que cada país deberá contar con su propia producción de clamidiosporas y determinar la manera más conveniente de suministrarla a los animales. Como una de las consecuencias epidemiológicas en la utilización de hongos destructores de nematodos produce una progresiva reducción de infectividad de las pasturas, sin mostrar efectos adversos al medio ambiente (Gronvold *et al.*, 2000).

De igual manera se pueden utilizar una combinación de otras estrategias que tengan una gama amplia de flexibilidad de aplicación con otros métodos de control,; por ejemplo se puede hacer una combinación con una suplementación alimenticia acorde a las necesidades nutricionales de los rumiantes, permitiendo de esta manera efectos indirectos sobre el control de las cargas parasitarias.

Para el uso compatible de nuevas tecnologías que se puedan usar para la producción ganadera, y en granjas de producción orgánicas libres de pesticidas. El control biológico, mediante el uso de enemigos naturales no es un concepto nuevo. Debido al desarrollo de la resistencia a los pesticidas ha vuelto a adquirir importancia (Hogsette, 1999).

Su principio básico de este medio, se basa en una idea simple. Esto consiste en establecer las especies de parásitos que se quieren controlar, para después identificar las especies nativas o exóticas de artrópodos que sean sus enemigos naturales, por tal motivo es esencial tener el conocimiento de la biología del enemigo natural, estudiando su multiplicación artificial masiva. Y con base a esto, se podrán realizar liberaciones de los enemigo naturales en contra de los nematodos.

9.2.2 Rotación de potreros

En este sistema de pastoreo, los animales no ocupan siempre toda el área de pastoreo (pastoreo continuo) sino que en momentos determinados, existen otras áreas que se mantienen sin pastorear (sin animales). A pesar de que el tiempo de pastoreo y descanso son variables y en general ajustados a la calidad y disponibilidad de forraje, los períodos de descanso son lo suficientemente largos, se ha visto que en climas templados 90 días de descanso son suficientes para reducir considerablemente las larvas en la pastura y en regiones más cálidas basta con 30 días.

9.2.3 Selección de genética de animales resistentes

El primer estadio en el que se reportaron diferencias entre razas ovinas a la infección por nematodos abomasales fue realizado por (Stewart *et al.*, 1937), quienes describieron una mayor resistencia de corderos Romney Marsh a *Ostertagia circumcincta* (actualmente *Teladorsagia circumcincta*), en comparación con corderos de las razas; Rambouillet, Shropshire, Southdown, Hampshire y cruza entre ellos. Sin embargo la primera evidencia de que la resistencia a la hemoncosis en ovinos tiene una base genética, fue reportada por (Ross *et al.*, 1959).

Desde entonces, se ha demostrado que algunas razas de borregos son más resistentes que otras a los nematodos gastroentéricos. Por otro lado se han realizado evaluaciones dentro de unas razas, encontrándose que existen diferencias individuales de susceptibilidad en cada una de ellas (Sréter *et al.*, 1994).

Asimismo dentro de los programas de selección genética, la resistencia a infecciones parasitarias es uno de los caracteres más útiles ya que al reducir el número de parásitos, se limitan las consecuencias sobre la producción de huevos y disminuye la contaminación de los potreros; además de que cuenta con valores medios de heredabilidad de (0.25-0.35).

Los animales resistentes tienen la habilidad de resistir al establecimiento y posterior desarrollo de la infección parasitaria, mediante procesos inmunitarios; los individuos resistentes a las infecciones parasitarias tienen la capacidad de

albergar o soportar un cierto número de larvas, disminuyendo el nivel de producción de huevos dentro del abomaso.

9.2.4 Control mediante extractos de plantas naturales

Una de las alternativas adicionales para el control parasitario es el recurrir al uso de extractos de vegetales, bajo un concepto etnobotánico que explota el conocimiento acumulado por las comunidades indígenas de América tropical (Gari, 2000). Aunque muchos de los pesticidas actuales tuvieron su origen en extractos vegetales (por ejemplo, en el caso del crisantemo y los piretroides), la visión etnobotánica le brinda una diferente connotación; ya que no se trata de preparar unos extractos de una planta para venderlos en la industria farmacéutica (como fue la visión de los años setenta y ochenta), si no conocer las plantas para incentivar su cultivo y uso de las unidades de producción de los ganaderos, para el control parasitario.

Los institutos nacionales y regionales de la investigación, principalmente aquellos relacionados con la Amazonía, han iniciado esfuerzos de investigación en este sentido, dirigidos hacia la situación del control de enfermedades parasitarias que se encuentran en el ganado. En Cuba se ha probado que el extracto y frutos de *Bromelia pinguin* (piña de ratón) posee una actividad como terapéutico contra estrongilidos gastrointestinales del bocino, fundamentalmente contra *H. contortus* (Marrero *et al.*, 1994).

Existen otras experiencias en Colombia, Venezuela y algunos países de América central utilizando el árbol del Neem, *Azadirachta indica* tanto para el control parásitos externos (Benavides *et al.*, 2001), e internos (Pietrsemoli *et al.*, 1999); en este último caso no está claro si el efecto antiparasitario es debido al principio activo del Neem, la Azadiractina, o si es debió al contenido de taninos de la planta, que mejoran el aprovechamiento de la proteína a nivel ruminal.

Dentro de otras alternativas de medicina natural para el control de parásitos que están empezando a ser consideradas en las iniciativas de investigación se destacan, el árbol del Mamey, *Mammea americana*, nativo del caribe, el cual tradicionalmente se ha usado en la región para el tratamiento de enfermedades parasitarias de la piel y recibió recientemente la evaluación en el laboratorio demostrando un efecto acaricida (Oliveros *et al.*, 1996).

Adicionalmente en la Amazonia se cuenta con una planta conocida por las comunidades indígenas como: Huagra Chondur., el cual se trata de una Ciperacea (*Cyperus prolyxus*), el cual se le indican propiedades antihelmínticas (Gari, 2000). Para todas estas iniciativas se requiere de apropiada investigación que valide con el método científico los reclamos de efectos benéficos brindados por las etnias nativas.

En México no es la excepción se han tenido experiencias positivas a nivel de laboratorio en experimentos *in vitro* e *in vivo* sobre el uso algunas leguminosas arbóreas como: *Lysiloma latisilicum* (Torres-Acosta *et al.*, 2012; Elke von Son, *et al.*, 2012), *Pithecellobium dulce* y *Lysiloma acapulscensis* (Olmedo *et al.*, 2014), en contra de algunos NGI de ovinos y caprinos.

En general el antiparasitario es un recurso necesario pero no renovable, en la medida que la resistencia va avanzando progresivamente sobre los más modernos grupos químicos disponibles. Para esto se requiere promover un cambio en la manera de pensar y de abordar la problemática del control de parásitos por parte de ganaderos, asesores técnicos, laboratorios, entidades de investigación y demás grupos involucrados.

El cambio conceptual se refiere a dejar de creer que los productos químicos son una fuente inagotable y que son la única alternativa para el control de los parásitos del ganado. En este sentido, se requiere una constante de acción de extensión

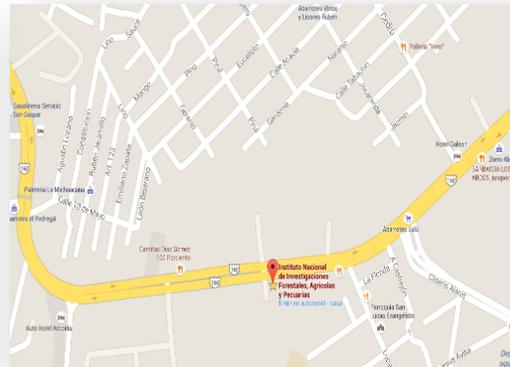
vinculación y conocimiento por parte de instituciones y centros de investigación hacia los ganaderos.

La tecnología no-química disponible actualmente, no es capaz de sustituir completamente a las drogas, pero sin duda es una herramienta alterna para el control de los NGI. Es por ello que implica una necesidad impostergable para el productor, los gobiernos y las industrias farmacéuticas.

X. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1 Zona de estudio

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Helmintología, en las instalaciones del Centro Nacional de Investigación, Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET), del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Ubicado en la Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla No. 8534 Col. Progreso, C.P Jiutepec, Morelos / A.P. 206 CIVAC



Las instalaciones del laboratorio de Helmintos tiene un latitud norte de $18^{\circ}53'06.85''$ y una latitud oeste de $99^{\circ}09'24.01''$ a 1369 metros sobre nivel del mar (msnm) con un clima clima subhúmedo, con temperaturas máximas y mínimas de 32°C a 21.5°C , y una precipitación pluvial media de 900 mm.

10.1.2 Material vegetativo

Se colectaron hojas frescas (jóvenes y maduras) de la zona sur del municipio de Temascaltepec de Gonzales Estado de México, se almacenarán y trasladarán en

refrigeración para evitar cambios en su composición (Salem *et al.*, (2006). Se utilizaron 200 g de hojas secas en sombra molidas y se sometieron a un proceso de maceración con una mezcla de agua y metanol (70:30 v/v) durante 24 horas, posteriormente se filtró la solución mediante diferentes filtros, utilizando (gasa, algodón y papel filtro) con la finalidad de obtener un extracto libre de material vegetal.

Una vez obtenido el extracto, se congeló a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y finalmente se procedió a un proceso de liofilización. El extracto liofilizado fue congelado para su posterior uso (Salem *et al.*, 2006).



Secado de hojas en la sombra



Muestra macerándose



Filtración del extracto



Proceso de liofilizado



Extracto liofilizado

10.2 Material biológico

10.2.1 Obtención de las larvas de *Haemonchus contortus*

Para la obtención de las larvas frescas, se utilizará un ovino donador, infectado artificialmente vía oral con una dosis de 350 larvas L3 de *H. contortus* por kg de peso. Diariamente se colectarán las heces sobre una palangana de plástico. Las heces se homogenizarán con agua corriente y hule espuma para permitir aireación, evitar malos olores y proliferación de larvas de mosca. La palangana con el cultivo se cubrirá con papel aluminio el cual se la harán ranuras que serán cubiertas con tela gasa que funcionaran como respiradero permitiendo el intercambio de gases. Estos cultivos se dejarán en reposo durante siete días a temperatura ambiente, durante este periodo de manera manual, se removerá el medio para una mejor oxigenación (Liévano, 2004).



Trascurridos los siete días de incubación, se elaboraran muñones con tela de gasa, donde serán envueltas las muestras de heces para la recuperación de larvas utilizando la técnica de Baerman o método de migración larvaria. Este método consiste en utilizar embudos de plástico conectados a un tobo de ensayo de 10 ml a través de un trozo de manguera de hule látex.

Los embudos son colocados en un soporte especial de metal. Una vez colocados los embudos, se pondrán los muñones dentro de él y se le agregara agua

corriente suficiente para cubrir todo el muñón. Se dejara reposar durante 24 horas para que las larvas migren al fondo del tubo.



Pasando el tiempo de migración, las larvas pasaran por una malla de poros amplios a fin de quitar residuos grandes, el líquido obtenido se colocara en tubos de 50 ml y se almacenara a 4°C durante 2 horas con el objetivo por segunda vez la técnica de Baermann. Finalmente el líquido obtenido se almacenara a 4°C para su posterior uso (Liévano, 2004).

10.2.2 Desarrollo in vitro de la larva histiotróficas (L₄) de *H. contortus*

El desarrollo de esta técnica será llevado a cabo mediante la elaboración de coprocultivos de heces obtenidas directamente del recto de un ovino donador para la obtención de incubación de huevos para finalmente obtener las larvas infectantes (L₃) de *H. contortus*. Para eliminar los detritos y restos de material de desecho, se hará una separación por gradientes de densidad y centrifugación con sacarosa al 40%, la vaina será eliminada con hipoclorito de sodio de al 0.187% y lavada con agua destilada.

Las larvas infectantes sin vaina, se someterán a un tratamiento con antibiótico-antimicótico (100x, Amersham, UK.) para evitar el efecto de bacterias y hongos sobre el cultivo de L₄. Las L₃ serán incubadas a 37°C en solución salina Amortiguadora de fosfatos estéril pH 4 y agitación por un periodo de dos horas.

Posteriormente, las L₃ se colectaran por centrifugación a 4°C para su uso inmediato.

10.2.3 Obtención de huevos de *Haemonchus contortus*

Se utilizaron huevos de *H. contortus* obtenidos a partir de un ovino artificialmente infectado con 350 larvas por kg/pv. Estos se concentraron mediante el paso de diferentes tamices (200, 100, 75 y 37 mm de diámetro) y fueron lavados con sacarosa al 40 %, para su posterior uso.

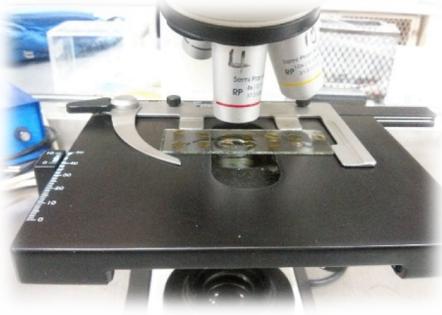
10.3 Confrontación del extracto hidroalcohólico de *Acacia cochliacantha* contra huevos y larvas L₃ del nematodo parásito *Haemonchus contortus*

10.3.1 Evaluación de la inhibición de la eclosión de huevos de *Haemonchus contortus* bajo condiciones *in vitro*

Se utilizaron placas de micro titulación de 96 pozos, con cuatro repeticiones (n=4). Los tratamientos fueron las concentraciones del extracto hidro-alcohólico de *A. cochliacantha* (100, 90, 80, 70, 60 y 50 mg/ mL), se utilizó ivermectina al 0.5 % como control positivo (C⁺) y agua como control negativo (C⁻). A cada pozo se le depositaron 100 huevos/ 50 µL y 50 µL de extracto o controles, utilizando un volumen final de 100 µL.

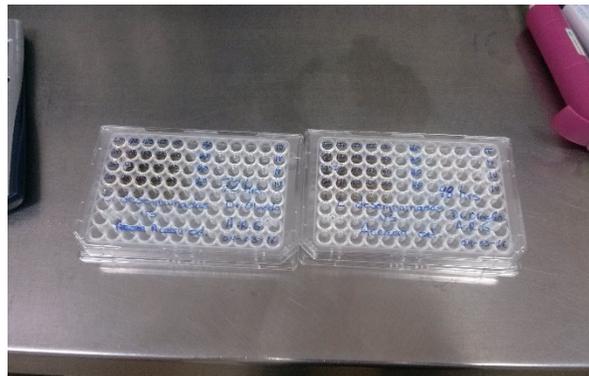


Posteriormente, las placas fueron incubadas a 28 °C, durante 48 horas y en seguida procedió a contar cada pozo tomando 10 alícuotas de 5 µL. El porcentaje de inhibición de huevos fue calculado mediante la siguiente formula: ((número de larvas/ (número de larvas +número de huevos))*100.

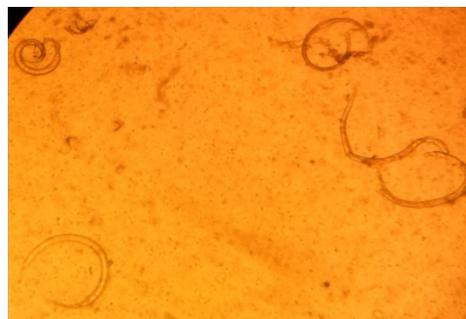
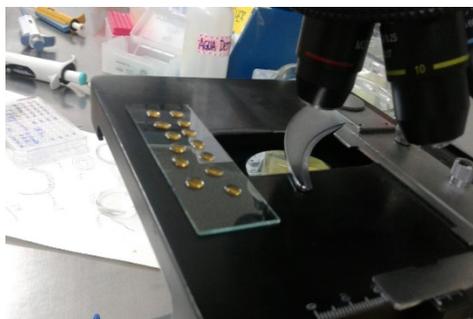


10.4 Evaluación del porcentaje de mortalidad de larvas L₃ de *Haemonchus contortus* confrontadas con el extracto hidroalcoholico de *Acaccia cochliacantha* bajo condiciones *in vitro*

Se utilizaron placas de micro titulación de 96 pozos, con cuatro repeticiones (n=4). Donde las concentraciones del extracto fueron de (200, 175, 150, 125 y 100 mg/mL), se utilizó como control positivo (C⁺) ivermectina al 0.5 % y agua como control negativo (C⁻). A cada pozo se le depositaron 100 larvas L₃/ 50 μ L y 50 μ L de extracto o controles, utilizando un volumen final de 100 μ L por pozo.



Posteriormente, las placas fueron incubadas a 28 °C, durante 24 horas y en seguida se procedió a contar cada pozo tomando 10 alícuotas de 5 µL. El porcentaje de mortalidad de larvas L₃ fue calculado mediante la siguiente formula:
 % de mortalidad = ((# de larvas vivas / (# de IL muertas + # de L vivas))*100.



10.5 Variables del experimento

- Las variables de este experimento fueron el porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos (IEH) y porcentaje de mortalidad de larvas (ML) L₃ expuestas a los diferentes tratamientos.

10.6 Análisis Estadístico

El diseño experimental implementado en ambos bioensayos fue un completamente al azar, mediante el modelo lineal general (SAS, 2006). La comparación de medias fue mediante la prueba de Tukey (P<0.05) (Steel y Torrie, 1988). Asimismo se utilizó la herramienta PROBIT del sistema SAS (2006), para calcular las concentraciones letales medias y altas.

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + E_{ijk}$$

Donde:

Y_{ij} = Variable respuesta (inhibición de la eclosión, porcentaje de mortalidad de L₃).

μ = Media general

α_i = Efecto del i-ésimo tratamiento (*acacia cochliacantha*, IVER Y AGUA)

E_{ij} = Error experimental

XI. Resultados

En el presente cuadro se observan las diferentes concentraciones que se utilizaron para el porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos (IEH) y porcentaje de mortalidad de larvas infectantes L₃ (MLI). Asimismo en ambos ensayos se observaron efectos dependientes a la concentración. Y a medida que aumentaba la concentración, aumentaba el efecto antihelmíntico.

Cuadro 4. Confrontación del extracto hidro-alcohólico de *Acacia cochliacantha* contra huevos y larvas L₃ del nematodo parásito *Haemonchus contortus*

Tratamientos	% IEH	% Mortalidad L3 sin vaina
Agua (C ⁻)	7.33e	1f
Ivermectina (C ⁺)	100a	100 ^a
Extracto <i>Acacia</i> (mg/mL)		
50	26.5d	---
60	47.1c	---
70	57.25c	---
80	77b	---
90	93.5a	
100	100a	25e
125	---	46d
150	---	73c
175	---	90b
200	---	98ab
CV	9.13	5.48
EEM	0.25	0.27

CV= coeficiente de variación; EEM= error estándar de la media; medias con distinta literal entre columnas estadísticamente difieren (P<0.05)

Observándose de una manera más clara los efectos obtenidos de la evaluación del extracto hidro-alcohólico de *Acaccia cochliacantha* contra el porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos y porcentaje de mortalidad de larvas infectantes L₃ a sus diferentes concentraciones de ambos ensayos en las presentes gráficas.

Figura 10. Porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos del nematodo parásito *Haemonchus contortus* contra diferentes concentraciones de extracto hidro-alcohólico de *Acacia cochliacantha* a las 48h

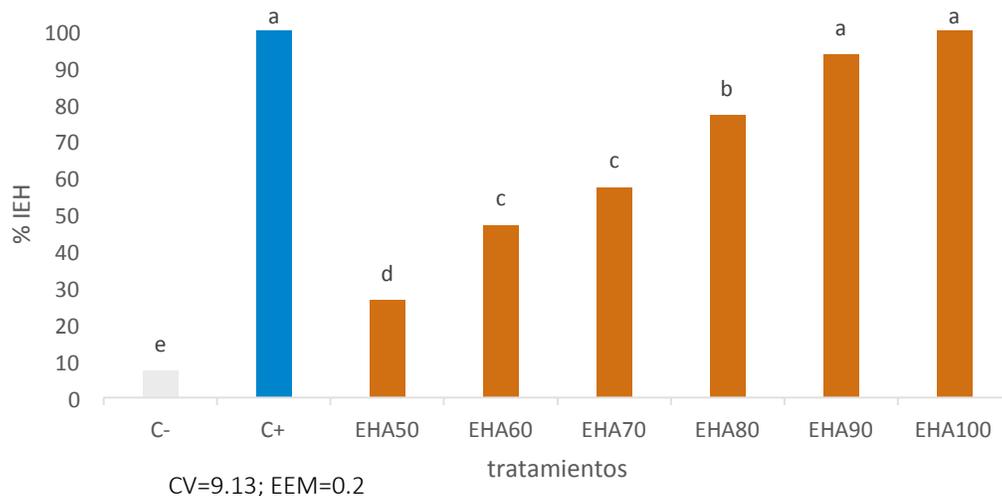
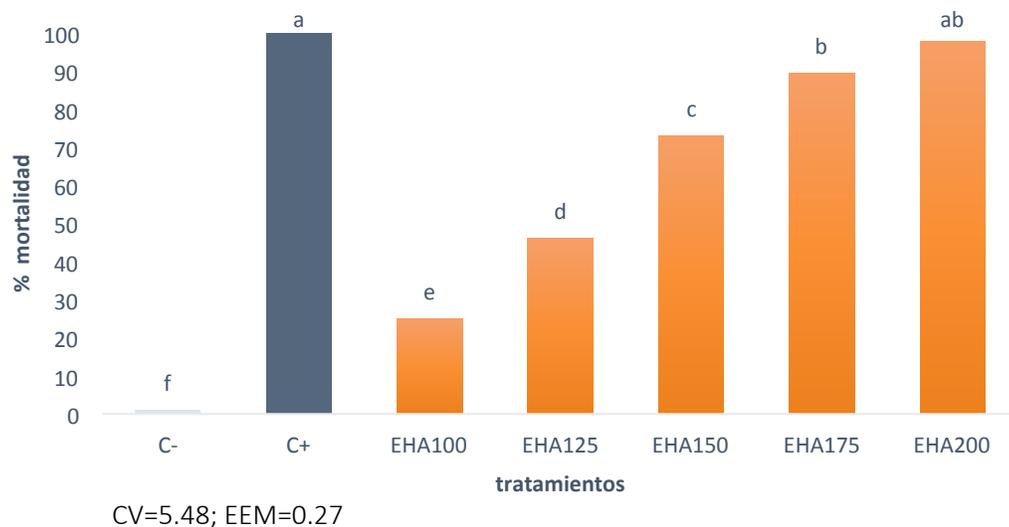


Figura 11. Porcentaje de mortalidad de larvas infectantes L₃ sin vaina del nematodo parásito *Haemonchus contortus* contra diferentes concentraciones de extracto hidro-alcohólico de hojas de *Acacia cochliacantha* a las 24h



Por otra parte mediante la herramienta PROBIT del sistema SAS (2006), se determinaron las concentraciones letales medias y altas con sus límites de confianza de los diferentes tratamientos del extracto hidro-alcohólico de *Acacia cochliacantha* para el porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos y porcentaje de mortalidad de larvas infectantes L₃ sin vaina del nematodo parásito *Haemonchus contortus*.

Cuadro 5. Concentraciones letales medias (CL₅₀) y altas (CL₉₀) del extracto hidro-alcohólico de *Acacia cochliacantha*, sobre el porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos (IEH) y porcentaje de mortalidad de larvas infectantes L₃ (MLI) de *Haemocus contorus*

Prueba	Concentraciones letales (mg/ mL)				
	CL ₅₀	Límites de confianza		CL ₉₀	Límites de confianza
Inhibición de la eclosión (IEH)	66.01	63.39	88.31	88.31	86.18 90.78
Mortalidad (MLI)	127.39	123.99	130.33	177.88	172.90 183.77

Posteriormente para calcular las concentraciones medias y altas para el porcentaje de inhibición de huevos y el porcentaje de mortalidad de larvas infectantes L₃, se utilizó la herramienta del PROBIT del sistema SAS (2006). Demostrando de una manera más visible en las presentes gráficas.

Figura 11. Determinación de la CL₅₀ y CL₉₀ para el extracto hidro-alcohólico de hojas de *acacia cochliacantha* contra la inhibición de la eclosión huevos del nematodo parásito *Haemonchus contortus*

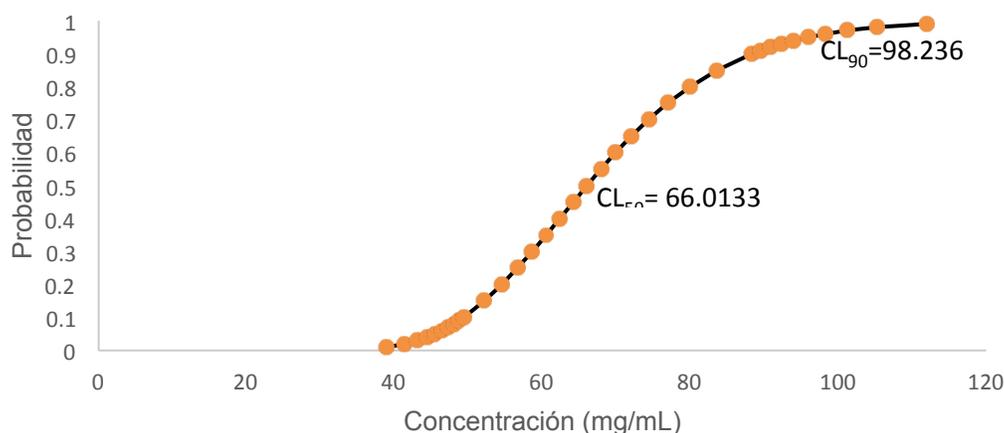
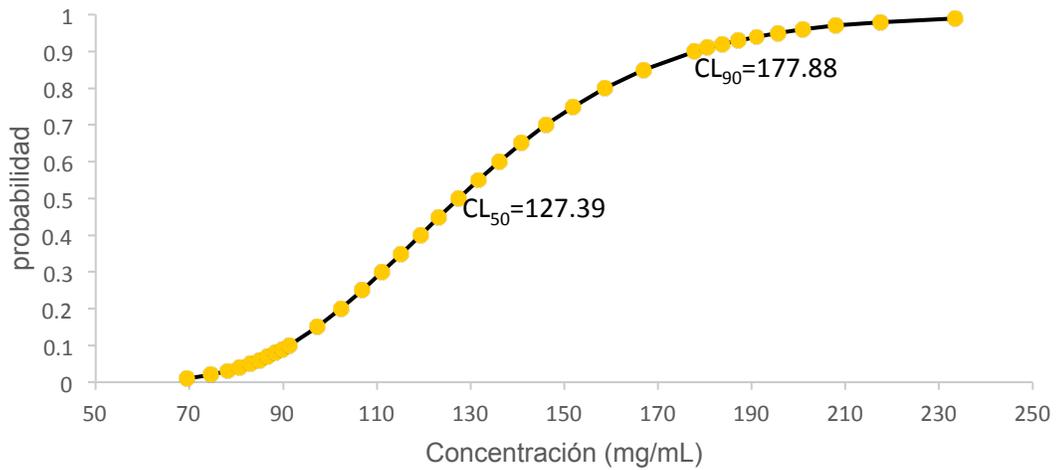


Figura 12. Determinación de la CL_{50} y CL_{90} para el extracto hidro-alcohólico de hojas de *Acacia cochliacantha* contra el porcentaje de mortalidad de larvas infectantes L_3 sin vaina del nematodo parásito *H. contortus*



XII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Como conclusiones las leguminosas arbóreas por sus propiedades nutricionales y medicinales (nutracéuticas), representan una importante oportunidad para ser investigadas, para su posible uso como alimento nutracéutico (Olmedo *et al.*, 2015, von Son *et al.*, 2015). Ya que en la actualidad en otros países se han evaluado *in vitro* en donde se demuestra que las leguminosas tienen propiedades antihelmínticas contra nematodos gastrointestinales NGI. Asimismo una de las características importantes que tienen estas plantas es su contenido de compuestos secundarios (taninos, compuestos fenólicos y flavonoides).

Por consiguiente la leguminosa *Acacia cochliacantha* se evaluó bajo condiciones *in vitro*, donde la literatura y otras investigaciones reportan que es rica principalmente en taninos y algunos flavonoides como el kaempferol y la quercetina (Olivares-Pérez *et al.*, 2013; Sibaja-Hernández *et al.*, 2015), por lo que la actividad nematicida del extracto hidro-alcohólico de *Accia cochliacantha* utilizado podría estar relacionado con alguno de estos dos compuestos secundarios, debido a que se hizo una extracción con una mezcla de solventes de alta y mediana polaridad (agua y metanol), lo cual estos solventes extraen flavonoides y taninos.

En la figura 12 se observan las probabilidades de las concentraciones letales medias y altas del bioensayo de la inhibición de la eclosión de huevos IEH (CL₅₀ y₉₀, 60.01 y 98.23 mg/ ml), posteriormente en la figura 13 se observan las probabilidades de las concentraciones letales medias y altas de la prueba del porcentaje de mortalidad de larvas infectantes L₃ MLI (CL₅₀ y₉₀, 127.39 y 177.88 mg/ ml), comparando las probabilidades de diferentes bioensayos realizados con el extracto hidro-alcohólico de *Acacia cochliacantha*, se observa que las

concentraciones letales medias y altas de IEH son inferiores al de las concentraciones letales medias y altas del %MLI L₃.

Esto podría deberse a las propiedades bioquímicas del huevo, ya que este se encuentra cubierto por lipoproteínas, quitina y una capa interna de vitelina que es la que protege la estructura del huevo, por lo que los compuestos con actividad antihelmíntica AH del extracto hidro-alcohólico tienen más afinidad de adherirse a las proteínas de la membrana de los huevos, además por la complejidad de la estructura del huevo que es menos a la estructura de la larva infectante L₃.

En el experimento con larvas infectantes L₃ se confrontaron sin vaina, con el objetivo de evaluar el daño externo e interno de estas al estar en contacto con las diferentes concentraciones del extracto hidro-alcohólico de *Acacia cochliacantha*, cabe resaltar que las larvas que estuvieron en contacto con el extracto se observó un daño en su estructura externa como en la parte posterior (cavidad bucal), y la parte inferior. Por consiguiente los compuestos con la actividad AH del extracto utilizado de *Acacia cochliacantha*, al igual que en los huevos se adhieren a la cutícula de las larvas, mismas que contienen glicoproteínas, en donde estas desempeñan un papel muy importante dentro del organismo de los nematodos, ya que son las encargadas de remover sustancias extrañas o agentes tóxicos como son los fármacos para su sobrevivencia.

Por lo tanto este podría ser el mecanismo de acción de algunos compuestos como los taninos y flavonoides que se encargan de bloquear esas proteínas inhibiendo la eclosión de los huevos y matando a las larvas infectantes L₃. De acuerdo con los resultados obtenidos de ambos ensayos se concluye que a nivel *in vitro* el extracto hidro-alcohólico de la leguminosa *Acacia cochliacantha* tiene actividad antihelmíntica por lo que sería conveniente determinar el perfil fitoquímico con el objetivo de identificar los compuestos que presentan la actividad nematicida.

Asimismo este experimento marca la pauta para realizar una evaluación del extracto *in vivo* en animales parasitados artificialmente, con el objetivo de determinar las concentraciones letales del extracto y en un futuro utilizarlo como una alternativa de control contra los nematodos gastrointestinales siendo un producto nutracéutico.

XIII. Bibliografía

- Aathanasiadou *et al.*, 2001, 2004; Githiori *et al.*, 2006; . (2006). In vitro effects of *Tabernaemontana citrifolia* extracts on *Haemonchus contortus*. *EL SEVIER*, 2-5.
- Arece, Githiori. (2004). In vitro effect of the aqueous extract of *Dichrostachys cinerea* (L.) Wight & Arn. on the development of exogenous stages of gastrointestinal strongyles in sheep. *Pastos y Forrajes*, 2.
- Armour J, Ogbourne. (1982). Bovine Ostertagiasis. *CAB Miscellaneous publication n. 7 of the Commonwealth institute of parasitology. fahrham Royal, England*, 93.
- Barger, I. (1985). the statistical distribution of trichostrongylid nematodes in grazin lambs. *international Journal for Parasitoly*, 15: 645-649.
- Barger, I.A.; Siale, K; Banks, D.J.D and LeJambre, L.F. (1994). Rotacional grazing for control of gastrointestinal nematodes of goats in a wet tropical environment. *veterinary parasitology*, 53: 109-116.
- Barnes, E., & Dobson, R. y. (1995). Worm control and anthelmintic resistance: adventures with a model. *parasitology today*, 55-63.
- Barron, G. (1997). the Nematode-Destroying Fungi. *Topics in microbiology No. 1; Canadian Biological publications; Guelph, Ontario/Canada*, 140p.
- Bath. (2000). trial design and requeriments-comemercial farms. *FAO TCP Workshop*, 40-43.
- Bath. (2000b). trial design and requirements-Commercial farms. *FAO TCP Workshop*, 2000: 40-43.
- Bath, G. (2003). *resistencia de los antiparasitarios, estado actual con énfasis en América Latina*. ROMA: Dirección de producción y Sanidad Animal de la FAO.
- Benavides O., E., Hernández M., G., & Romero N., A. C. (2001). Evaluacion preliminar de extractos del Neem (*Azadirachta indica*) como alternativa para el control de la garrapata del ganado *Boophilus microplus* (Acari: Ixodida). *revista colombiana de Entomología*, 1-8.

- Bissest, S. (2000). practical ways of implementing identification of hostresistance in sheep and its use in breeding programmes. *FAO TCP Workshop. sustainable Worm Control Programmmes for sheep and Goats*, 16-21.
- Borchert, A. (1981). *parasitologia veterinaria*. Ed. Acribia. Zaragoza.
- col, B. P. (1993). evaluation of pepsinogen, gastrin and antibody response in diagnosing ostertagiasis . *EL SEVIER* , 175-195.
- col, C. G. (1994). recomendation for the control ofantihelminthic resistan nematodes of farm animals. *Eu. Vet Rec*, 205-206.
- coli, C. G. (1994). anthermintic-resistant nematodes in the EU. *parasitol today* , 288-289.
- CONDER GA, CAMPBELL WC. (1995). chemotherapy of nematode infectionce. *Adv. parasito*, 1-84.
- Francisco Padilla Álvarez, F. P. (2003). *Zoologia Aplicada* . españa: Diaz de Santos.
- Hickman, C.P.L.S Roberts y F.M Hckman . (1991). *zoologia aplicada*. madrid : ed. interamericana McGraw-Hill.
- jordano Barea, D. johnstoner. (1951-1998). *biologia aplicada* . cordoba : ed. S.E.U de cordoba .
- klongsiriwet, C. J.-H. (2015). synergistic inhibition of haemonchus contortus exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. *international journal for parasitology: drugs and drug resistance*, 5, 17-134.
- Marie-Magdeleine. (2009). *el sevier* .
- N, D. B. (1988). *estudio epidemiologico sobre los nematodos gástricos ovinos de la provincia de león, con especial referencia a Ostertagia ss. doctoral*. universidad de león: facultad de veterinaria.
- Olivares-Pérez, J. A.-N.-P.-O.-H. (2013). Nutritional quality of Pithecellobium dulce and Acacia cochliacantha fruits, and its evaluation in goats. . *Livestock Production Science*, 154, 74-78.
- olmedo, J. A. (2014). in vitro of pithecellobium dulce and Lysiloma acapulcensis on the exogenous development of gastrointestinal strongyles in sheep. *Italian Journal of Animal Science*, 13, 303-307.

- Olmedo, J. A. (2015). Extracto de *Lysiloma acapulcensis* en la digestibilidad y fermentación ruminal de una dieta para ovinos. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 2 (5), 173-182.
- Salem, A. Z.-A. (2006). Nutritive evaluations of some browse tree foliages during the dry season: secondary compounds, feed intake and in vivo digestibility in sheep and goat. . *Animal Feed Science and Techonology*, 127, 251-267.
- SAS Institute, *User's Guide: Statistics. Ver 9.0 SAS Intitut, cary.* (2006). N. C. USA: 956 p.
- Sibaja-Hernández, R. R.-G.-J.-M. (2015). Physicochemical, shear flow behaviour and emulsifying properties of *Acacia cochliacantha* and *Acacia farnesiana* gums. . *Industrial crops and Products*, 67, 161-168.
- Vázquez, A. M. (1999). *parasitología Veterinaria*. España: McGRAW-HILL . INTERAMERICANA.
- Von Son-de-Fenex, E. A. (2012). In vitro anthelmintic activity of five tropical legumes on exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Experimental Parasitology*, 131, 413-418.